

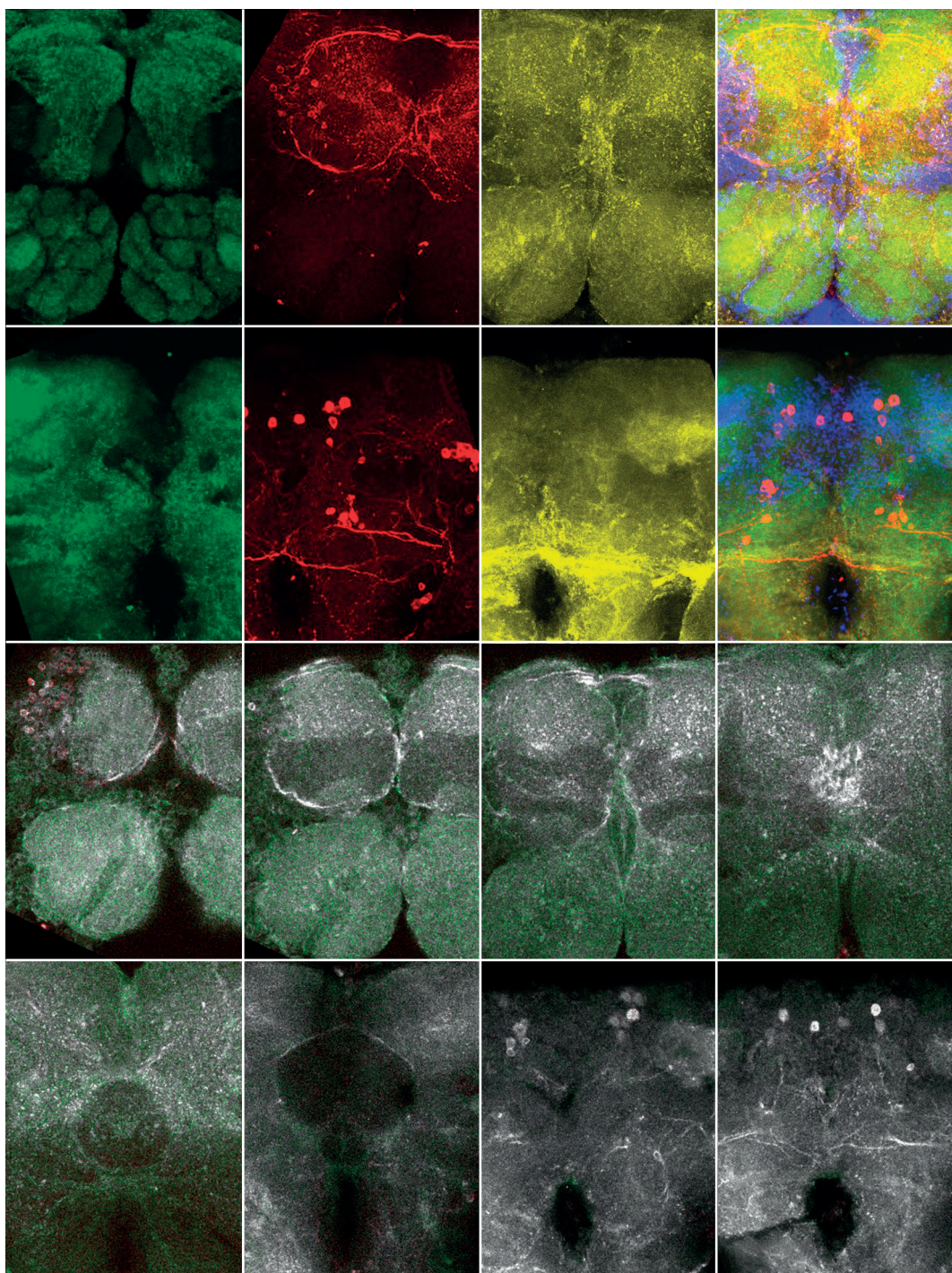
ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2023 • 27 • 3

Генетика и селекция растений / Генетика человека / Генетика насекомых / Генетика микроорганизмов /
Биоинформатика



vavilov.ejpub.ru/
bioenet.nsc.ru/vogis
vavilov_journal@bioenet.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-23-24

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 – академик 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. Rogozin – 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 – академик 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-23-24

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

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, Full 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

Генетика и селекция растений

- 189 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
SWEET транспортеры *Medicago lupulina* в арбускулярно-микоризной системе в условиях среднего уровня доступного фосфора. А.А. Крюков, А.О. Горбунова, Т.Р. Кудряшова, О.Б. Иванченко, М.Ф. Шишова, А.П. Юрков
- 197 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние генов *NAM-1* на содержание белка в зерне и показатели продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала в условиях Беларуси. О.А. Орловская, С.И. Вакула, К.К. Яцевич, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский
- 207 **ОБЗОР**
Морфогенетические особенности репродуктивной биологии в селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Т.П. Жужжалова, А.А. Налбандян, Е.Н. Васильченко, Н.Н. Черкасова

Генетика человека

- 218 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оценка роли отбора в эволюции митохондриальных геномов коренного населения Сибири. Б.А. Малайчук, М.В. Деренко
- 224 **ОБЗОР**
Генетический контроль N-гликозилирования белков плазмы крови человека. С.Ж. Шарапов, А.Н. Тимощук, Ю.С. Аульченко

Генетика насекомых

- 240 **ОБЗОР**
Видовая идентификация паутиных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae): обзор методов. А.В. Разуваева, Е.Г. Ульянова, Е.С. Сколотнева, И.В. Андреева
- 250 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние LIM-киназы 1 на память и брачную песню самцов дрозофилы зависит от типа нейронов. А.В. Журавлев, Е.С. Заломаева, Е.С. Егорова, А.Д. Емелин, В.В. Сокурова, Е.А. Никитина, Е.В. Савватеева-Попова (на англ. языке)

Генетика микроорганизмов

- 264 **ОБЗОР**
О природе пикобирнавирусов. А.Ю. Кашников, Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова
- 276 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Обнаружение генных кластеров биодеструкции алканов и ароматических соединений в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. Ю.А. Маркова, И.С. Петрушин, Л.А. Беловежец

Биоинформатика

- 283 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Компиляция и функциональная классификация генов, ассоциированных с длиной теломера, у человека и других видов животных. Е.В. Игнатьева, Н.С. Юдин, Д.М. Ларкин

Plant genetics and breeding

- 189 **ORIGINAL ARTICLE**
SWEET transporters of *Medicago lupulina* in the arbuscular-mycorrhizal system in the presence of medium level of available phosphorus. A.A. Kryukov, A.O. Gorbunova, T.R. Kudriashova, O.B. Ivanchenko, M.F. Shishova, A.P. Yurkov
- 197 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of *NAM-1* genes on the protein content in grain and productivity indices in common wheat lines with foreign genetic material introgressions in the conditions of Belarus. O.A. Orlovskaya, S.I. Vakula, K.K. Yatsevich, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky
- 207 **REVIEW**
Morphogenetic peculiarities of reproductive biology in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding. T.P. Zhuzhzhlova, A.A. Nalbandyan, E.N. Vasilchenko, N.N. Cherkasova

Human genetics

- 218 **ORIGINAL ARTICLE**
Evaluating the role of selection in the evolution of mitochondrial genomes of aboriginal peoples of Siberia. B.A. Malyarchuk, M.V. Derenko
- 224 **REVIEW**
Genetic control of N-glycosylation of human blood plasma proteins. S.Zh. Sharapov, A.N. Timoshchuk, Y.S. Aulchenko

Insect genetics

- 240 **REVIEW**
Species identification of spider mites (Tetranychidae: Tetranychinae): a review of methods. A.V. Razuvaeva, E.G. Ulyanova, E.S. Skolotneva, I.V. Andreeva
- 250 **ORIGINAL ARTICLE**
LIM-kinase 1 effects on memory abilities and male courtship song in *Drosophila* depend on the neuronal type. A.V. Zhuravlev, E.S. Zalomaeva, E.S. Egozova, A.D. Emelin, V.V. Sokurova, E.A. Nikitina, E.V. Savvateeva-Popova

Microbial genetics

- 264 **REVIEW**
On the nature of picobirnaviruses. A.Yu. Kashnikov, N.V. Epifanova, N.A. Novikova
- 276 **ORIGINAL ARTICLE**
Detection of gene clusters for biodegradation of alkanes and aromatic compounds in the *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D genome. Yu.A. Markova, I.S. Petrushin, L.A. Belovezhets

Bioinformatics

- 283 **ORIGINAL ARTICLE**
Compilation and functional classification of telomere length-associated genes in humans and other animal species. E.V. Ignatieva, N.S. Yudin, D.M. Larkin

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

SWEET транспортеры *Medicago lupulina* в арбускулярно-микоризной системе в условиях среднего уровня доступного фосфора

А.А. Крюков¹✉, А.О. Горбунова¹, Т.Р. Кудряшова^{1, 2}, О.Б. Иванченко², М.Ф. Шишова³, А.П. Юрков¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

✉ rainniar@rambler.ru

Аннотация. Грибы арбускулярной микоризы (АМ) помогают растениям усваивать из почвы минеральные вещества, особенно фосфор, в то время как получают от растений продукты фотосинтеза – сахара. Выявление генов, контролирующих симбиотическую эффективность АМ, может иметь практическое применение при создании высокопродуктивных растительно-микробных систем. Поэтому целью работы была оценка уровней экспрессии генов семейства транспортеров сахаров SWEET – единственного семейства, где могут быть обнаружены специфические для АМ-симбиоза транспортеры сахаров. Нами разработана уникальная высокочувствительная к уровню фосфора и микоризации модельная система «растение-хозяин–АМ-гриб», включающая высокоотзывчивую на инокуляцию АМ-грибами экологически облигатно микотрофную линию MIS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) и штамм АМ-гриба RCAM00320 *Rhizophagus irregularis*, обладающий высокой эффективностью на множестве видов растений. С использованием этой модельной системы в корнях растения оценены изменения в уровне экспрессии 11 генов, кодирующих транспортеры семейства SWEET, при развитии либо при отсутствии симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в различные фазы развития растения-хозяина в условиях среднего уровня доступного для питания растений фосфора в субстрате. У микоризованных растений обнаружены более высокие уровни экспрессии в большинстве фаз развития растения-хозяина для *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET12*, *MISWEET13* по сравнению с контролем без АМ. Повышенная относительно контроля экспрессия при микоризации наблюдалась также и для *MISWEET11* в фазу развития 2-го и 3-го листьев, для *MISWEET15c* – в фазу стеблевания, для *MISWEET1a* – в фазу 2-го листа, стеблевания и бокового ветвления. Ген *MISWEET1b* с уверенностью можно считать хорошим маркером со специфической экспрессией для эффективного развития АМ-симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в условиях среднего уровня доступного для растений фосфора в субстрате. Ключевые слова: арбускулярная микориза; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; SWEET; оценка экспрессии генов; гены транспортеров сахаров.

Для цитирования: Крюков А.А., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Иванченко О.Б., Шишова М.Ф., Юрков А.П. SWEET транспортеры *Medicago lupulina* в арбускулярно-микоризной системе в условиях среднего уровня доступного фосфора. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(3):189-196. DOI 10.18699/VJGB-23-25

SWEET transporters of *Medicago lupulina* in the arbuscular-mycorrhizal system in the presence of medium level of available phosphorus

А.А. Kryukov¹✉, А.О. Gorbunova¹, Т.Р. Kudriashova^{1, 2}, О.Б. Ivanchenko², М.Ф. Shishova³, А.П. Yurkov¹

¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

✉ rainniar@rambler.ru

Abstract. Arbuscular mycorrhiza (AM) fungi receive photosynthetic products and sugars from plants in exchange for contributing to the uptake of minerals, especially phosphorus, from the soil. The identification of genes controlling AM symbiotic efficiency may have practical application in the creation of highly productive plant-microbe systems. The aim of our work was to evaluate the expression levels of SWEET sugar transporter genes, the only family in which sugar transporters specific to AM symbiosis can be detected. We have selected a unique “host plant–AM fungus” model system with high response to mycorrhization under medium phosphorus level. This includes a plant line which is highly responsive to inoculation by AM fungi, an ecologically obligate mycotrophic line MIS-1 from black medick (*Medicago lupulina*) and the AM fungus *Rhizophagus irregularis* strain RCAM00320, which has a high efficiency in a number of plant species. Using the selected model system, differences in the expression levels of 11 genes encoding SWEET transporters

in the roots of the host plant were evaluated during the development of or in the absence of symbiosis of *M. lupulina* with *R. irregularis* at various stages of the host plant development in the presence of medium level of phosphorus available for plant nutrition in the substrate. At most stages of host plant development, mycorrhizal plants had higher expression levels of *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET12* and *MISWEET13* compared to AM-less controls. Also, increased expression relative to control during mycorrhization was observed for *MISWEET11* at 2nd and 3rd leaf development stages, for *MISWEET15c* at stemming (stooling) stage, for *MISWEET1a* at 2nd leaf development, stemming and lateral branching stages. The *MISWEET1b* gene can be confidently considered a good marker with specific expression for effective development of AM symbiosis between *M. lupulina* and *R. irregularis* in the presence of medium level of phosphorus available to plants in the substrate.

Key words: arbuscular mycorrhiza; *Medicago lupulina*; *Rhizophagus irregularis*; SWEET; gene expression assessment; sugar transporter genes.

For citation: Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Ivanchenko O.B., Shishova M.F., Yurkov A.P. SWEET transporters of *Medicago lupulina* in the arbuscular-mycorrhizal system in the presence of medium level of available phosphorus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):189-196. DOI 10.18699/VJGB-23-25

Введение

Растительные транспортеры сахаров относятся к трем ключевым семействам – Sucrose Transporters SUT (SUC), Monosaccharide Transporters – MST (включая подсемейства STP, TMT, PMT, VGT, pGlcT/SGB1, ESL, INT) и Sugars Will Eventually be Exported Transporters – SWEET. SUT транспортеры участвуют в загрузке флоэмы сахарозой и ее дальнем транспорте из листьев в другие части растения, где сахара расщепляются на моносахариды и транспортируются в клетки уже MST белками.

Наименее изученная группа – семейство транспортеров SWEET, которые являются энергонезависимыми и двунаправленными трансмембранными переносчиками различных сахаров во всех органах и тканях растений. В этом семействе транспортеров, впервые описанном в 2010 г. L.Q. Chen с коллегами, согласно современным представлениям, могут быть выявлены белки, специфичные для развития АМ-симбиоза, в то время как среди представителей двух других семейств транспортеров сахаров специфичные для АМ-симбиоза белки не найдены (Chen et al., 2010; Doidy et al., 2019). В настоящее время известно, что транспортеры SWEET встречаются у всех живых организмов (Feng et al., 2015). В то же время отмечается, что число изоформ этих транспортеров отличается даже у близких видов. Нумерация новых белков SWEET и их изоформ у других организмов проводится согласно их ортологии с белками у *Arabidopsis thaliana*.

В результате ранних исследований транспортеров оказалось, что гены *SWEET* растений, несмотря на низкую гомологию, группируются в четыре клады (Chen et al., 2015). Представители каждой из клад наблюдаются почти у всех наземных растений. Считается, что представители четырех клад разделяются не только филогенетически, но и функционально. Так, отмечают, что представители: клада I и II этих белков транспортируют гексозы, клады III – в основном участвуют в транспорте сахарозы, и клады IV – преимущественно включены в процессы транспорта фруктозы (Chen et al., 2012; Feng et al., 2015).

Белки SWEET участвуют во множестве процессов. Кроме транспорта сахаров, по-видимому, они могут участвовать в транспорте и других веществ, например гиббереллинов, что было показано для арабидопсиса (Kanno et al., 2016). В литературе имеется много данных о функциях белков SWEET у разных видов растений. Например,

транспортер MtSWEET1b, возможно, снабжает глюкозой грибы АМ (An et al., 2019), LjSWEET3 опосредует транспорт сахарозы (Sugiyama et al., 2017) к клубенькам *Lotus japonicus*. Вероятно, транспортеры SWEET клады I участвуют в снабжении сахарами симбиотических систем (Doidy et al., 2019). Патогены ризосферы могут вызывать повышенный синтез белков клады III, что приводит к дополнительному транспорту сахарозы в корни и способствует питанию ризосферных микроорганизмов (Doidy et al., 2019). В работе (Chen et al., 2010) показано, что патогенные бактерии, например, рода *Xanthomonas*, могут попадать в ткани растения-хозяина и индуцировать экспрессию генов *SWEET*, кодирующих транспортеры из клады III (в первую очередь, *SWEET11* и *SWEET14*), для получения сахаров. Подобно симбиотическим АМ-грибам, патогенные грибы также способны индуцировать экспрессию генов для получения сахаров.

J. Manck-Gotzenberger и N. Requena (2016) отмечают, что гены многих транспортеров имеют значительный уровень экспрессии в АМ-симбиозе, но при этом не являются специфическими для него. В работе (Kafle et al., 2019) продемонстрировано, что ортологи *SWEET1*, *MtSWEET1.2* и *PsSWEET1.2*, могут экспрессироваться как в микоризованных корнях, так и в корневых клубеньках. Поэтому ортологи транспортеров клады I (*MtSWEET1*-*MtSWEET3*) и III (*MtSWEET9*-*MtSWEET15*) в первую очередь рассматриваются как активные участники симбиотических отношений «растение–гриб АМ» (Крюков и др., 2021).

Роль транспортеров SWEET в становлении симбиотических отношений еще не исследована на высокоэффективных растительно-микробных системах (РМС) целенаправленно. Целью настоящей работы было оценить экспрессию генов *SWEET* в модельной РМС при микоризации и отсутствии ее на разных этапах развития растения.

Материалы и методы

Растительный и грибной материал. Люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L. subsp. *vulgaris* Koch) – широко распространенный вид рода *Medicago*, самоопыляемый диплоид. В настоящем исследовании использована селекционированная авторами сильно отзывчивая на микоризацию линия MIS-1 из сортопопуляции ВИК32 люцерны хмелевидной (Yurkov et al., 2015). Растения этой линии проявляют признаки карликовости без инокуляции

АМ-грибом и при низком уровне доступного фосфора в почве (Рд) (Yurkov et al., 2015, 2020). Для инокуляции использовали эффективный штамм RCAM00320 АМ-гриба *Rhizophagus irregularis* (ранее известного как *Glomus intraradices* Shenck & Smith; штам CIAM8 из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии). Уточненная идентификация штамма проведена А.А. Крюковым и А.П. Юрковым (Крюков, Юрков, 2018). Поскольку АМ-грибы являются облигатными симбионтами, штамм поддерживается на накопительной культуре плектрантуса (*Plectranthus* sp., видовой идентификация растения в настоящее время уточняется авторами) при стандартных условиях в лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных микроорганизмов ВНИИСХМ (Юрков и др., 2010).

Вегетационный метод. Протокол метода описан в работе А.П. Юркова с коллегами (Yurkov et al., 2015). Оптимальные условия для развития АМ предотвращали спонтанное заражение клубеньковыми бактериями и другими микроорганизмами. Смесь почвы и песка в соотношении 2:1 дважды автоклавируют при 134 °С, 2 атм в течение 1 часа с повторным автоклавированием через двое суток; токсичность после такой обработки не возникала. Растения высаживали по два проростка на один сосуд, наполненный почвенно-песчаной смесью (210 г). Агрохимическая характеристика почвы представлена в работе (Yurkov et al., 2015). Содержание P_2O_5 (по Кирсанову) в почве составляло 23 мг/кг почвы, до постановки опыта было добавлено 0.5 дозы фосфора в форме $CaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (86 мг/кг почвы) согласно прописи Д.Н. Прянишникова (Клечковский, Петербургский, 1967). Конечное содержание фосфора в почвенно-песчаной смеси составило 109 мг/кг и соответствовало среднему уровню Рд, т. е. обеспеченности почвы подвижными фосфатами по содержанию в вытяжке Кирсанова, согласно (Соколов, 1975); pH_{KCl} – 6.44. Первый учет растений проводили на 21-е сутки от посадки и инокуляции с последующими учетами в ключевые стадии онтогенеза люцерны. Общее количество учетов – 7 (Приложение 1)¹.

Проанализированы растения, инокулированные и неинокулированные корнями плектрантуса, микоризованные штаммами RCAM00320 *R. irregularis*. При сборе материал замораживали в жидком азоте и хранили до 6 мес. при –80 °С.

Выделение РНК и оценка экспрессии генов интереса. Подбор генов интереса проведен на основе результатов анализа транскриптома *M. truncatula* (*MtSWEET1a* = Medtr1g029380, *MtSWEET1b* = Medtr3g089125, *MtSWEET2a* = Medtr8g042490, *MtSWEET2b* = Medtr2g073190, *MtSWEET2c* = Medtr6g034600, *MtSWEET3a* = Medtr3g090940, *MtSWEET3b* = Medtr3g090950, *MtSWEET3c* = Medtr1g028460, *MtSWEET4* = Medtr4g106990, *MtSWEET5a* = Medtr6g007610, *MtSWEET5b* = Medtr6g007637, *MtSWEET5c* = Medtr6g007623, *MtSWEET5d* = Medtr6g007633, *MtSWEET6* = Medtr3g080990, *MtSWEET7* = Medtr8g099730, *MtSWEET9a* = Medtr5g092600, *MtSWEET9b* = Medtr7g007490,

MtSWEET11 = Medtr3g098930, *MtSWEET12* = Medtr8g096320, *MtSWEET13* = Medtr3g098910, *MtSWEET14* = Medtr8g096310, *MtSWEET15a* = Medtr2g007890, *MtSWEET15b* = Medtr5g067530, *MtSWEET15c* = Medtr7g405730, *MtSWEET15d* = Medtr7g405710, *MtSWEET16* = Medtr2g436310; номера последовательностей – из базы данных <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) с последующим подбором последовательностей праймеров к генам интереса.

Для каждого гена тестировали три пары праймеров. На основании электрофореза и кривых плавления оценивали отсутствие второго продукта. Эффективность праймеров рассчитывали с помощью ПЦР-РВ (количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени) серийных разведений матрицы кДНК. В работу были приняты праймеры с эффективностью, равной или близкой к 100 %. Тест праймеров проводили для нескольких сроков учета (Приложение 2).

В 2022 г. соответствие и качество праймеров были проверены с использованием транскриптомных данных M1S-1 *M. lupulina* (MACE-секвенирование). Тотальная РНК из растительного материала выделена с применением тризольного метода с модификациями (MacRae, 2007). Качество обработки ДНКазой проверяли в ПЦР на РНК с референсным геном – актином – непосредственно перед синтезом кДНК. Синтез кДНК осуществлен с использованием набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase в соответствии с протоколом производителя набора (Thermo Scientific, США). Для синтеза кДНК отобрано по ~1 мкг тотальной РНК. Качество кДНК проверено с помощью убиквитинового теста.

Изменения экспрессии генов оценены с применением метода ПЦР-РВ с использованием термоциклера реального времени BioRad CFX-96 (Bio-Rad, США) и набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I. Параметры циклов амплификации следующие: 95 °С, 5 мин, 1 цикл; 95 °С, 15 с, 60 °С, 30 с, 72 °С, 30 с, 40 циклов. Оценку специфичности амплификации проводили с использованием анализа кривых плавления. Изменения уровня экспрессии гена интереса в опыте сравнивали с уровнем экспрессии данного гена в контроле, анализ выполнен с применением $2^{-\Delta\Delta CT}$ метода. Уровни генной экспрессии нормализованы с помощью выбранного референсного гена – актина, согласно (Yurkov et al., 2020). ПЦР-микс (10 мкл) содержал: 1 мкл 10х буфера В + SYBR Green, 1 мкл 2.5 мМ dNTP, 1 мкл $MgCl_2$ (25 мМ), 0.3 мкл каждого из пары праймеров (10 мМ для каждого праймера), 0.125 мкл (0.625 ед.) SynTaq ДНК-полимеразы (производитель компонентов микса – «Синтол», Россия), 4.275 мкл ddH₂O, 2 мкл кДНК образца. Проведена оценка относительных значений уровня экспрессии генов по кДНК для каждого образца (опыт – с АМ, контроль – без АМ). Биологическая повторность равна 3, техническая повторность – 4 измерения.

Оценка параметров симбиотической эффективности и активности. Для окрашивания образцов корней трипановым синим использован метод J.M. Phillips и D.S. Nauman (1970). Параметры активности АМ-гриба в корне, индексы микоризации рассчитаны согласно работе (Воробьев и др., 2016): *a* и *b* – обилие арбускул и ве-

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx7.pdf>

зикул в микоризированных частях корней соответственно, M – интенсивность развития АМ в корне, – имеют следующие расчетные формулы:

$$M = \frac{(95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + 1n_1)}{N} \%, \quad (1)$$

где n_5 – число полей зрения с классом плотности микоризы – $M = 5$; n_4 – с $M = 4$; n_3 – с $M = 3$ и т. д.; M оценивается от 1 до 5 баллов: 1 балл: 0–1 % микоризы в корне в поле зрения микроскопа, 2 балла: 2–10 %, 3 балла: 11–50 %, 4 балла: 51–90 %, 5 баллов: 91–100 %.

$$a = \frac{(100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1)}{100} \%, \quad (2)$$

где $mA_i =$

$$= \frac{(95n_5mA_i + 70n_4mA_i + 30n_3mA_i + 5n_2mA_i + 1n_1mA_i)F}{M(N - n_0)} \%, \quad (3)$$

где $n_i mA_j$ – число полей зрения с $M = i$; $A = j$; F – встречаемость микоризной инфекции (доля полей зрения с АМ по отношению к общему числу полей зрения в одном образце корней); N – общее число просмотренных полей зрения; n_0 – число полей зрения без АМ; n_i – число полей зрения с классом плотности микоризы от 1 до 5; A_i – класс плотности арбускул от 1 до 3.

$$b = \frac{(100mB_3 + 50mB_2 + 10mB_1)}{100} \%, \quad (4)$$

где $n_i mB_j$ – число полей зрения с $M = i$ и B (класс плотности везикул) = j рассчитываются аналогично расчету для арбускул (3); B_j – класс плотности арбускул от 1 до 3.

Симбиотическая эффективность АМ оценена как разница показателя продуктивности (сырой вес надземных частей) между вариантом с инокуляцией АМ («+АМ») и

контролем без АМ («безМ»), разделенная на значение в варианте «безМ», – стандартный расчет MGR (mycorrhizal growth response) (Kaur et al., 2022). Биологическая повторность при оценке параметров эффективности и активности АМ в каждом варианте – 8 растений.

Статистический анализ. Для сравнения различий всех показателей в качестве post-hoc теста использовали ANOVA и HSD-тест Тьюки ($p < 0.05$); также применяли t -критерий Стьюдента ($p < 0.05$) для оценки значимости различий средних значений уровня экспрессии генов между вариантами «+АМ» и «безМ».

Результаты

Результаты оценки симбиотической эффективности и параметров микоризации показали, что изучаемую симбиотическую тест-систему *Medicago lupulina* + *Rhizophagus irregularis* следует считать высокоэффективной (с высоким MGR) и симбиотически активной – с высокой микоризацией корней мицелием, арбускулами и везикулами – в условиях среднего уровня доступного для растений фосфора в субстрате.

Анализ данных по микоризации *M. lupulina* АМ-грибом *R. irregularis* показал, что интенсивность микоризации (М, рис. 1, б), как и обилие везикул (в, см. рис. 1, г) имели существенное снижение в фазу начала бокового ветвления (48 сут) при сохранении высоких параметров обилия арбускул (а, см. рис. 1, в) – основных симбиотических структур АМ и симбиотической эффективности (MGR), рассчитанной по сырому весу надземных частей (см. рис. 1, а).

Полученные данные по микроскопии и оценке MGR свидетельствуют в пользу того, что анализируемая высокоэффективная и активная РМС, обладающая ранним

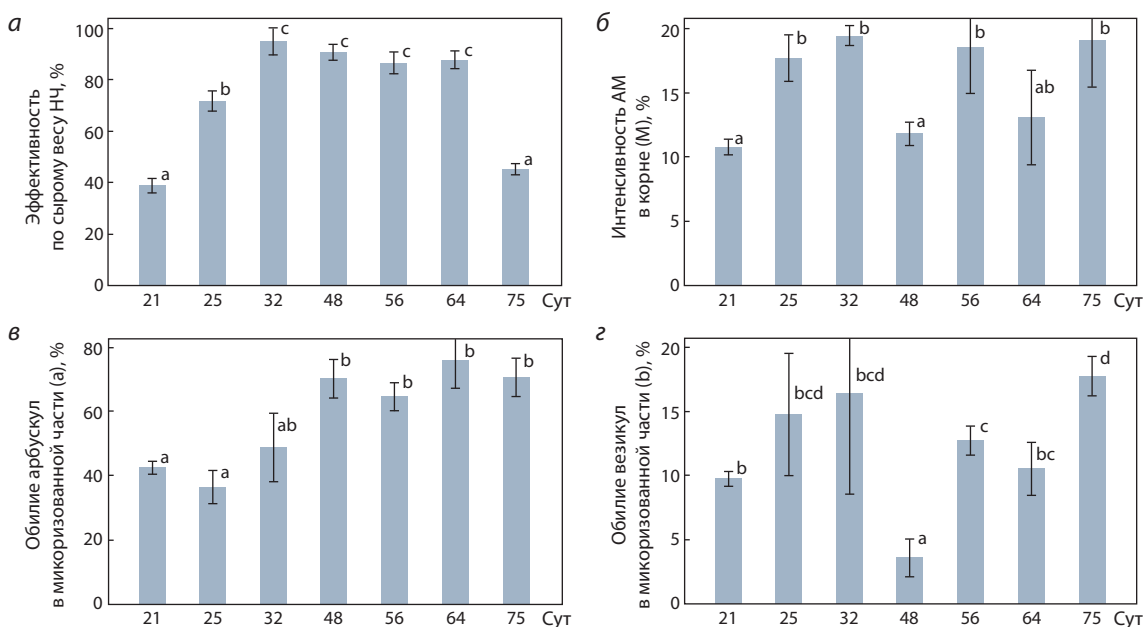


Рис. 1. Симбиотическая эффективность АМ, рассчитанная по сырому весу надземных частей (а); интенсивность микоризации (М, б); обилие арбускул (в) и обилие везикул (г), образуемых *R. irregularis* в корнях *M. lupulina*.

Представлены средние значения с ошибкой среднего; НЧ – надземные части; сут – сутки от посадки и инокуляции. Буквами а, б, в, г отмечены значения, имеющие достоверные ($p < 0.05$) различия. Достоверно не отличающиеся друг от друга значения обозначены одинаковыми буквами или сочетанием букв (ab, bcd, bc).

и пролонгированным откликом, может использоваться в качестве генетической модели для поиска и анализа генов-маркеров развития эффективного АМ-симбиоза с раннего этапа (фазы развития 2-го настоящего листа) до поздней фазы начала плодоношения в условиях среднего уровня Рд в субстрате. С этой целью проведено измерение экспрессии 11 генов семейства SWEET. Оценивали относительный уровень транскриптов (нормализованное значение $2^{-\Delta\Delta C_t}$) в корнях *M. lupulina* с нормализацией к контролю без АМ (рис. 2).

Следует отметить, что у части генов не было выраженной разницы в вариантах с микоризой и без нее. Тем не менее результаты показали наличие генов, которые имели достоверно более высокую экспрессию при АМ в большинстве фаз развития растения-хозяина: *MISWEET3c*, *MISWEET1b*, *MISWEET12*, *MISWEET13*. Повышенная относительно контроля экспрессия при микоризации наблюдалась и для *MISWEET11* на 1-й и 2-й сроки анализа (в фазу развития 2-го и 3-го листа), для *MISWEET15c* – на 3-й срок в фазу стеблевания. Значительно более высокой экспрессией при микоризации обладали гены: *MISWEET1a* – на 1, 3 и 5-й сроки (в фазу 2-го листа, стеблевания и бокового ветвления соответственно) и *MISWEET1b* – на все 7 сроков учета, причем его экспрессия на 1, 2 и 7-й сроки (в фазу 2-го и 3-го листа и фазу начала плодоношения соответственно) была микоризоспецифической.

Обсуждение

Согласно полученным результатам, в корнях микоризованных растений *M. lupulina*, в сравнении с растениями без АМ, наблюдалась более высокая экспрессия генов семейства SWEET (см. рис. 2): в фазу 2-го листа (21-е сут) – у шести генов; в фазу начала стеблевания (25-е сут) – у трех генов; в фазу стеблевания (32-е сут) – у шести генов; в фазу начала бокового ветвления (48-е сут) – у трех генов; в фазу бокового ветвления (56-е сут) – у двух генов; в фазу начала цветения (64-е сут) – у трех генов; в фазу начала плодоношения (75-е сут) – у трех генов. Сниженной экспрессией в корнях растений с АМ характеризовались (см. рис. 2): на 21-е сутки – один ген; на 25-е сутки – пять генов; на 32-е сутки – один ген; на 4-е сутки – четыре гена; на 56-е сутки – восемь генов; на 64-е сутки – четыре гена; на 75-е сутки – два гена.

Исходя из этого, можно предположить, что в фазу стеблевания (32-е сут) становление и поддержание АМ требовало усиленного транспорта сахаров, что привело к повышенной экспрессии наибольшего числа (6) генов семейства SWEET в АМ и к сниженной экспрессии (лишь 1 гена) при микоризации, а фаза начала бокового ветвления (48-е сут) характеризовалась, наоборот, резким снижением экспрессии – наблюдалась повышенная экспрессия только у 3 генов при АМ, а количество генов с пониженной экспрессией возросло до 4. Фаза развития бокового ветвления стебля (56-е сут) сопровождалась еще более слабой экспрессией генов. Следует отметить, что наблюдаемая взаимосвязь с фазой развития растения-хозяина имела место и в наших исследованиях (Yurkov et al., 2021), в которых было показано, что роль фазы развития в формировании метаболизма растения выше, чем влияние собственно инокуляции эффективным грибом АМ в

условиях низкого Рд в субстрате. Это объясняет причину того, что анализ экспрессии генов был проведен с учетом сроков перехода растений в новую фазу развития.

В настоящем исследовании выявлено, что симбиотическая пара «линия MIS-1 *M. lupulina* + штамм RCAM00320 *R. irregularis*» сохраняет высокую эффективность в условиях среднего уровня Рд (см. рис. 1, а), хотя и меньшую, чем в условиях низкого Рд (Yurkov et al., 2020, 2021). Данная модельная РМС также сохраняет высокие параметры микоризации на протяжении всего развития от фазы развития 2-го листа до поздней фазы начала плодоношения, исключая снижение параметров интенсивности микоризации (М) и обилия везикул (b) в фазу начала бокового ветвления (см. рис. 1, б, в) на 48-е сут от момента посадки. Примечательно, что только в эту фазу наблюдалась более низкая относительная экспрессия у 8 из 11 изученных генов в корнях растений с АМ в сравнении с предыдущим сроком: *MISWEET1a*, *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET11*, *MISWEET12*, *MISWEET13*, *MISWEET15c*, *MISWEET16* (см. рис. 2).

Исследования на низком уровне Рд в субстрате также показали существенные изменения в фазу начала бокового ветвления, но иного характера: к этому сроку наблюдалось развитие АМ-симбиоза с наибольшей эффективностью и существенными метаболическими перестройками (Yurkov et al., 2021).

В условиях среднего Рд в субстрате среди исследованных генов семейства SWEET, как правило, более высокой экспрессией при микоризации характеризовались лишь гены *MISWEET1b*, *MISWEET3c*, *MISWEET12*, *MISWEET13* (см. рис. 2).

Сведения о локализации и функции белков семейства SWEET в литературе пока недостаточны и противоречивы, но можно предполагать, что некоторые будут идентичными для гомологов между разными видами растений. Так, известно, что VfsWEET1 у *Vernicia fordii* обнаружен в листьях (Cao et al., 2019), SisWEET1a – у *Solanum lycopersicum* – в молодых листьях и цветках (Ho et al., 2019), TaSWEET1b1-1B – у *Triticum aestivum* в стебле, StSWEET1h и StSWEET1i – в листьях, стеблях, корне, BrSWEET1b – у *Brassica rapa* в корне (Li et al., 2018); MtSWEET1b – у *M. truncatula* в семенах и клубеньках (Hu et al., 2019). Следует заметить, что экспрессия гена *SWEET1b* фиксируется в исследованиях в основном в надземных частях, тогда как в нашем исследовании его специфичность в АМ показана в корнях в условиях роста при среднем уровне фосфора в субстрате.

Продукты ортолога гена *MISWEET3c* локализованы в цветках, черешках листьев, бобах, стеблях, семенах, корнях и клубеньках у *M. truncatula* и переносят глюкозу (Hu et al., 2019), но, например, у *Lotus japonicus* они переносят сахарозу, но не глюкозу, по иным сведениям, – 2-дезоксиглюкозу (Sugiyama et al., 2017). Таким образом, не только локализация, но и функции белков семейства SWEET пока являются предметом дискуссий.

Продукты ортологов генов *MISWEET12* и *MISWEET13* переносят сахарозу у *S. lycopersicum* и *Manihot esculenta* (Cohn et al., 2014; Zhao et al., 2018). У *M. truncatula* MtSWEET13 обнаружен в цветках, листьях, черешках листьев, стеблях и семенах, MtSWEET12 – во всех орга-

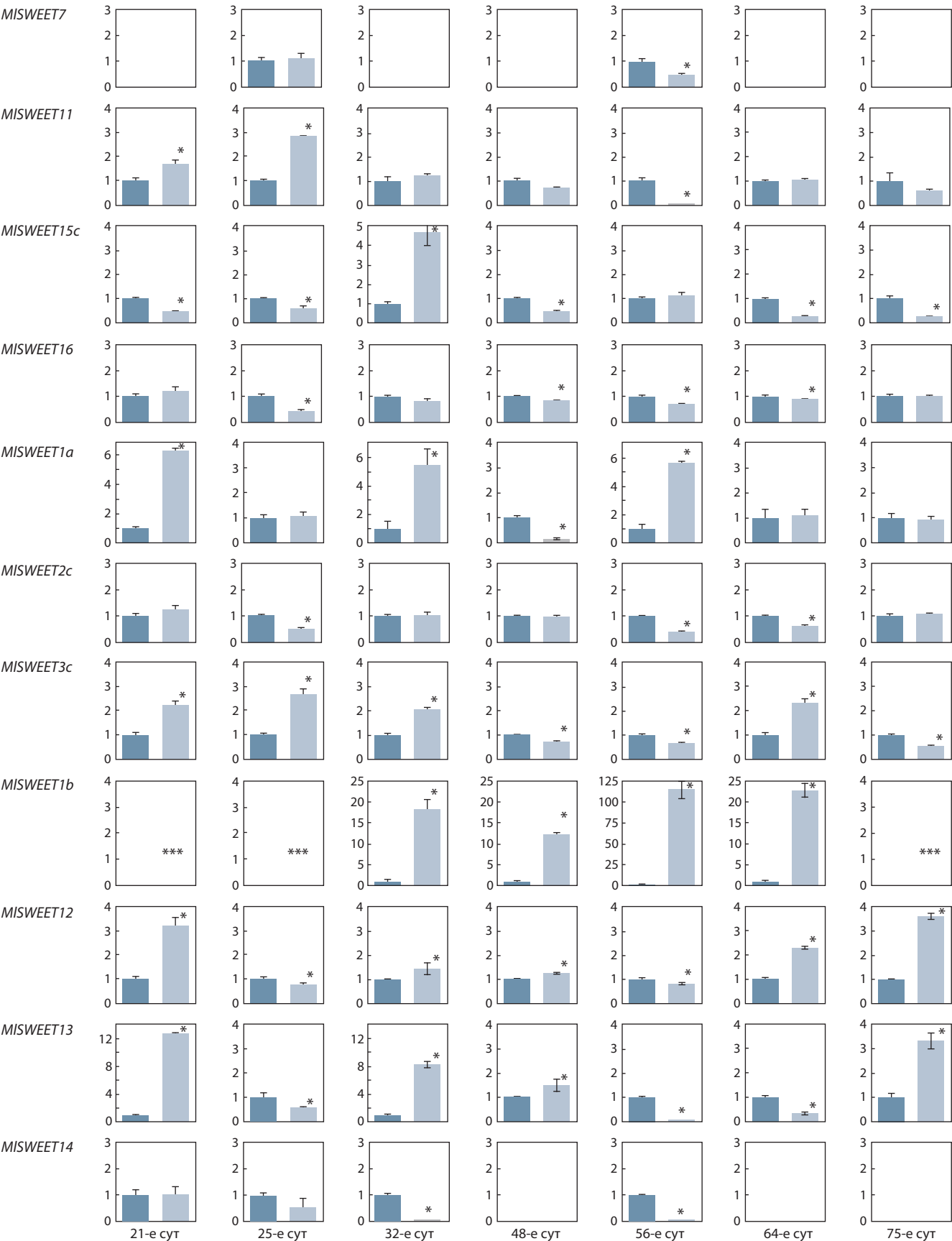


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов (нормализованное значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$) генов семейства SWEET в корнях *M. lupulina*. Представлены средние значения с ошибкой среднего. * Наличие достоверных ($p < 0.05$) различий между вариантом «безМ» (темный столбик) и вариантом «+AM» с инокуляцией *R. irregularis* (светлый столбик); пустые диаграммы – отсутствие экспрессии генов в вариантах; сут – сутки от посадки. *** Специфическая экспрессия гена в варианте «+AM»).

нах (Hu et al., 2019). Таким образом, мы наблюдаем, что транспортеры *MISWEET12* и *MISWEET13* – полифункциональны. Функции продуктов ортологов *MISWEET12* – отток сахарозы из листьев для загрузки флоэмы (Chen et al., 2012, 2015) и устойчивость к патогенам (Cohn et al., 2014; Zhao et al., 2018; Gautam et al., 2019). А функции продуктов ортологов *MISWEET13* – развитие пыльцы (Sun et al., 2013), устойчивость к патогенам (Cohn et al., 2014; Zhao et al., 2018), возможны отложение примексина, загрузка флоэмы (Chen et al., 2012; Gautam et al., 2019), а также транспорт гиббереллина (Kanno et al., 2016; Jeena et al., 2019).

В нашей работе на всех сроках учета *MISWEET1b* показал высокую экспрессию при микоризации (см. рис. 2). Этот ген с уверенностью можно считать хорошим маркером эффективного развития АМ-симбиоза *M. lupulina* с *R. irregularis* в условиях среднего уровня Рд в субстрате. Следует заметить, что *MISWEET1b* обладал специфической экспрессией в корнях при АМ на 1, 2 и 7-й сроки учета (в фазы развития 2-го и 3-го листьев и плодоношения) (см. рис. 2). Возможно, в начальные этапы (1–2-й срок) этот ген специфически экспрессировался для формирования эффективного АМ-симбиоза (для перераспределения сахаров в пользу микосимбионта), а на позднем этапе экспрессировался в связи с падением симбиотической эффективности при переходе к плодоношению, когда растение-хозяин опять нуждается в поддержании эффективного АМ-симбиоза для обеспечения созревания семян.

Таким образом, выявлена взаимосвязь между фазой развития растения-хозяина *M. lupulina* и фазой развития АМ-симбиоза с *R. irregularis* с экспрессией специфического гена *MISWEET1b* у растений с АМ. Наши данные согласуются с результатами исследований на других видах растений. Так, в последних работах (начиная с 2016 г.) ортологи гена *MISWEET1b* также упоминаются как симбиотические с АМ у *S. tuberosum* и *M. truncatula* (Manck-Götzenberger, Requena, 2016; An et al., 2019; Doidy et al., 2019; Kaffle et al., 2019; Cope et al., 2022). Также это отмечено для генов ортологов *MISWEET3c* у *Lotus japonicus* и *M. truncatula* (Sugiyama et al., 2017; Cope et al., 2022), ортологов *MISWEET12* у *S. tuberosum* и *M. truncatula* (Manck-Götzenberger, Requena, 2016; Hennion et al., 2019; Cope et al., 2022).

Исходя из результатов работы и анализа литературных данных, можно предполагать, что при различных биотических и абиотических условиях (например, при разном химическом составе субстрата, обеспечении влагой, светом и пр.) экспрессия и функции генов *SWEET* могут существенно различаться.

Заключение

Экспрессия генов семейства *SWEET* практически не изучалась при переходе растений от начала одной фазы развития к другой, как это сделано в настоящем исследовании. Анализ экспрессии этих генов в корнях высокоотзывчивой на микоризацию линии *M. lupulina* в условиях среднего уровня Рд в субстрате выполнен впервые. Результаты показали, что экспрессия гена *MISWEET1b* специфически возрастала при снижении симбиотической эффективности, рассчитанной по весу сырых надземных частей.

Вероятно, высокая экспрессия в АМ-растениях в ранние сроки развития связана с активным перераспределением сахаров при формировании эффективной АМ, а в фазу плодоношения – с потребностями сахаров для созревания семян. Более половины изученных генов, среди которых следует выделить *MISWEET3c* и *MISWEET12*, также показали повышение экспрессии. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что специфические для АМ гены семейства *SWEET* могут быть найдены среди генов клад I и III.

Учитывая разнообразие ортологов у других видов растений, есть основания считать, что пока идентифицированы не все гены семейства *SWEET* как у исследуемого нами растения, *M. lupulina*, так и у других видов рода *Medicago*. Следует полагать, что в дальнейшем будут расширены и представления о функциях данных транспортеров у этого рода.

Список литературы / References

- Воробьев Н.И., Юрков А.П., Проворов Н.А. Программа для расчета индексов микоризации корней растений. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2010612112. Зарегистр. 12.02.2016. М.: ФИПС, 2016.
[Vorob'ev N.I., Yurkov A.P., Provorov N.A. Program for calculating the mycorrhization indices of plant roots. Certificate No. 2010612112 of state registration of a computer program. December 2, 2016. Moscow, 2016. (in Russian)]
- Клечковский В.М., Петербургский А.В. Агрохимия. М.: Колос, 1967.
[Klechkovsky V.M., Petersburgsky A.V. Agrochemistry. Moscow: Kolos Publ., 1967. (in Russian)]
- Крюков А.А., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Яхин О.И., Лубянов А.А., Маликов У.М., Шишова М.Ф., Кожемяков А.П., Юрков А.П. Транспортеры сахаров семейства *SWEET* и их роль в арбускулярной микоризе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):754-760. DOI 10.18699/VJ21.086.
[Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Yakhin O.I., Lubyantsev A.A., Malikov U.M., Shishova M.F., Kozhemyakov A.P., Yurkov A.P. Sugar transporters of the *SWEET* family and their role in arbuscular mycorrhiza. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):754-760. DOI 10.18699/VJ21.086. (in Russian)]
- Крюков А.А., Юрков А.П. Оптимизация процедуры молекулярно-генетической идентификации грибов арбускулярной микоризы в симбиотическую фазу на примере двух близкородственных штаммов. *Микология и фитопатология*. 2018;52(1):38-48.
[Kryukov A.A., Yurkov A.P. Optimization procedures for molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi in symbiotic phase on the example of two closely kindred strains. *Mikologiya i Fitopatologiya* = *Mycology and Phytopathology*. 2018;52(1):38-48. (in Russian)]
- Соколов А.В. Агрохимические методы исследования почв. М.: Наука, 1975.
[Sokolov A.V. Agrochemical Methods of Soil Research. Moscow: Nauka Publ., 1975. (in Russian)]
- Юрков А.П., Шишова М.Ф., Семенов Д.Г. Особенности развития люцерны хмелевидной с эндомикоризным грибом. Саарбрюккен: LAP, 2010.
[Yurkov A.P., Shishova M.F., Semenov D.G. Features of the Development of Hop Clover with Endomycorrhizal Fungus. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2010. (in Russian)]
- An J., Zeng T., Ji C., Graaf S., Zheng Z., Xiao T., Deng X., Xiao S., Bisseling T., Limpens E., Pan Z. A *Medicago truncatula* *SWEET* transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 2019;224(1):396-408. DOI 10.1111/nph.15975.

- Cao Y., Liu W., Zhao Q., Long H., Li Z., Liu M., Zhou X., Zhang L. Integrative analysis reveals evolutionary patterns and potential functions of SWEET transporters in Euphorbiaceae. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;139:1-11. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.102.
- Chen L.Q., Cheung L.S., Feng L., Tanner W., Frommer W.B. Transport of sugars. *Annu. Rev. Biochem.* 2015;84(1):865-894. DOI 10.1146/annurev-biochem-060614-033904.
- Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*. 2010;468(7323):527-532. DOI 10.1038/nature09606.
- Chen L.Q., Qu X.Q., Hou B.H., Sossó D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*. 2012;335(6065):207-211. DOI 10.1126/science.1213351.
- Cohn M., Bart R.S., Shybut M., Dahlbeck D., Gomez M., Morbitzer R., Hou B.H., Frommer W.B., Lahaye T., Staskawicz B.J. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2014;27(11):1186-1198. DOI 10.1094/MPMI-06-14-0161-R.
- Cope K., Kafle A., Yakha J., Pfeffer P., Strahan G., Garcia K., Subramanian S., Bücking H. Physiological and transcriptomic response of *Medicago truncatula* to colonization by high- or low-benefit arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2022;32(3-4):281-303. DOI 10.1007/s00572-022-01077-2.
- Doidy J., Vidal U., Lemoine R. Sugar transporters in Fabaceae, featuring SUT MST and SWEET families of the model plant *Medicago truncatula* and the agricultural crop *Pisum sativum*. *PLoS One*. 2019;14(9):e0223173. DOI 10.1371/journal.pone.0223173.
- Feng C.Y., Han J.X., Han X.X., Jiang J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. *Gene*. 2015;573(2):261-272. DOI 10.1016/j.gene.2015.07.055.
- Gautam T., Saripalli G., Gahlaut V., Kumar A., Sharma P.K., Balyan H.S., Gupta P.K. Further studies on sugar transporter (SWEET) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Biol. Rep.* 2019;46:2327-2353. DOI 10.1007/s11033-019-04691-0.
- Hennion N., Durand M., Vriet C., Doidy J., Maurousset L., Lemoine R., Portau N. Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiol. Plant.* 2019;165(1):44-57. DOI 10.1111/pp1.12751.
- Ho L.H., Klemens P.A.W., Neuhaus H.E., Ko H.Y., Hsieh S.Y., Guo W.J. SISWEET1a is involved in glucose import to young leaves in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 2019;70(12):3241-3254. DOI 10.1093/jxb/erz154.
- Hu B., Wu H., Huang W., Song J., Zhou Y., Lin Y. SWEET gene family in *Medicago truncatula*: genome-wide identification, expression and substrate specificity analysis. *Plants*. 2019;8(9):338. DOI 10.3390/plants8090338.
- Jeena G.S., Kumar S., Shukla R.K. Structure, evolution and diverse physiological roles of SWEET sugar transporters in plants. *Plant Mol. Biol.* 2019;100(4-5):351-365. DOI 10.1007/s11103-019-00872-4.
- Kafle A., Garcia K., Wang X., Pfeffer P.E., Strahan G.D., Bücking H. Nutrient demand and fungal access to resources control the carbon allocation to the symbiotic partners in tripartite interactions in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ.* 2019;42(1):270-284. DOI 10.1111/pce.13359.
- Kanno Y., Oikawa T., Chiba Y., Ishimaru Y., Shimizu T., Sano N., Koshihara T., Kamiya Y., Ueda M., Seo M. AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat. Commun.* 2016;7:13245. DOI 10.1038/ncomms13245.
- Kaur S., Campbell B.J., Suseela V. Root metabolome of plant-arbuscular mycorrhizal symbiosis mirrors the mutualistic or parasitic mycorrhizal phenotype. *New Phytol.* 2022;234(2):672-687. DOI 10.1111/nph.17994.
- Li X., Si W., Qin Q., Wu H., Jiang H. Deciphering evolutionary dynamics of SWEET genes in diverse plant lineages. *Sci. Rep.* 2018;8(1):13440. DOI 10.1038/s41598-018-31589-x.
- MacRae E. Extraction of plant RNA. *Methods Mol. Biol.* 2007;353:15-24. DOI 10.1385/1-59745-229-7:15.
- Manck-Gotzenberger J., Requena N. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* 2016;7:487. DOI 10.3389/fpls.2016.00487.
- Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1970;55(1):158-161. DOI 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.
- Sugiyama A., Saida Y., Yoshimizu M., Takanashi K., Sossó D., Frommer W.B., Yazaki K. Molecular characterization of LjSWEET3, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(2):298-306. DOI 10.1093/pcp/pcw190.
- Sun M.X., Huang X.Y., Yang J., Guan Y.F., Yang Z.N. *Arabidopsis* *RPG1* is important for primexine deposition and functions redundantly with *RPG2* for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reprod.* 2013;26(2):83-91. DOI 10.1007/s00497-012-0208-1.
- Yurkov A.P., Jacobi L.M., Gapeeva N.E., Stepanova G.V., Shishova M.F. Development of arbuscular mycorrhiza in highly responsive and mycotrophic host plant – black medick (*Medicago lupulina* L.). *Russ. J. Dev. Biol.* 2015;46:263-275. DOI 10.1134/S1062360415050082.
- Yurkov A., Kryukov A., Gorbunova A., Sherbakov A., Dobryakova K., Mikhaylova Y., Afonin A., Shishova M. AM-induced alteration in the expression of genes, encoding phosphorus transporters and enzymes of carbohydrate metabolism in *Medicago lupulina*. *Plants*. 2020;9(4):486. DOI 10.3390/plants9040486.
- Yurkov A.P., Puzanskiy R.K., Avdeeva G.S., Jacobi L.M., Gorbunova A.O., Kryukov A.A., Kozhemyakov A.P., Laktionov Y.V., Kosulnikov Y.V., Romanyuk D.A., Yemelyanov V.V., Shavarda A.L., Kirpichnikova A.A., Smolikova G.N., Shishova M.F. Mycorrhiza-induced alterations in metabolome of *Medicago lupulina* leaves during symbiosis development. *Plants*. 2021;10(11):2506. DOI 10.3390/plants10112506.
- Zhao D., You Y., Fan H., Zhu X., Wang Y., Duan Y., Xuan Y., Chen L. The role of sugar transporter genes during early infection by root-knot nematodes. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(1):302. DOI 10.3390/ijms19010302.

ORCID ID

A.A. Kryukov orcid.org/0000-0002-8715-6723
A.O. Gorbunova orcid.org/0009-0002-5624-1244
T.R. Kudriashova orcid.org/0000-0001-5120-7229
M.F. Shishova orcid.org/0000-0003-3657-2986
A.P. Yurkov orcid.org/0000-0002-2231-6466
O.B. Ivanchenko orcid.org/0000-0002-1311-1258

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, 20-016-00245_А (оценка экспрессии генов семейства SWEET, оценка параметров продуктивности и симбиотической эффективности), РФФИ, 19-29-05275_мк (оценка параметров микорризации) и РНФ, № 22-16-00064 (подбор и проверка применимости использования праймеров к генам интереса).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.09.2022. После доработки 01.12.2022. Принята к публикации 01.12.2022.

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

Влияние генов *NAM-1* на содержание белка в зерне и показатели продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала в условиях Беларуси

О.А. Орловская , С.И. Вакула, К.К. Яцевич, Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
 O.Orlovskaya@igc.by

Аннотация. Современные сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), селекция которых велась в основном на увеличение продуктивности, часто имеют невысокое качество зерна. Обнаружение у сородичей пшеницы аллелей генов *NAM-1*, ассоциированных с высоким содержанием белка, увеличило значимость отдаленной гибридизации для повышения питательной ценности зерна *T. aestivum* L. Целью настоящей работы были изучение аллельного состава генов *NAM-A1* и *NAM-B1* у интрогрессивных линий пшеницы и их родительских форм и оценка эффекта различных вариантов генов *NAM-1* на содержание белка в зерне и признаки продуктивности пшеницы в полевых условиях Беларуси. Исследовали родительские сорта яровой мягкой пшеницы, образцы тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum*, а также 22 интрогрессивные линии, полученные с их участием (вегетационный период 2017–2021 гг.). Впервые установлены и зарегистрированы в международной молекулярной базе данных GenBank полноразмерные нуклеотидные последовательности гена *NAM-A1* образцов *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccum* к-45926, *T. kiharae*, *T. spelta* к-1731. В исследуемой выборке выявлено шесть комбинаций аллелей *NAM-A1/B1*, частоты встречаемости которых варьировали от 40 до 3 %. Совместный вклад генов *NAM-A1* и *NAM-B1* в изменчивость хозяйственно важных признаков пшеницы составил от 8–10 % (масса зерна с растения и масса 1000 зерен) до 72 % (накопление белка в зерне). Для большинства изученных признаков доля изменчивости, обусловленная погодными условиями, была невелика (1.57–18.48 %). Показано, что наличие функционального аллеля *NAM-B1* обеспечивает высокий уровень накопления белка в зерне независимо от погодных условий и при этом не приводит к существенному снижению массы 1000 зерен. Высокие показатели продуктивности и уровня накопления белка в зерне установлены для генотипов, сочетающих гаплотип *NAM-A1d* и функциональный аллель *NAM-B1*. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности интрогрессии функционального аллеля гена *NAM-B1* от видов-сородичей для повышения питательной ценности мягкой пшеницы. Ключевые слова: мягкая пшеница; сородичи пшеницы; интрогрессивные линии пшеницы; гены *NAM-1*; содержание белка в зерне; продуктивность.

Для цитирования: Орловская О.А., Вакула С.И., Яцевич К.К., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. Влияние генов *NAM-1* на содержание белка в зерне и показатели продуктивности у линий мягкой пшеницы с интрогрессиями чужеродного генетического материала в условиях Беларуси. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(3):197-206. DOI 10.18699/VJGB-23-26

Effect of *NAM-1* genes on the protein content in grain and productivity indices in common wheat lines with foreign genetic material introgressions in the conditions of Belarus

O.A. Orlovskaya , S.I. Vakula, K.K. Yatsevich, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
 O.Orlovskaya@igc.by

Abstract. Modern varieties of common wheat (*Triticum aestivum* L.) bred mainly for high productivity are often of low grain quality. The identification of *NAM-1* alleles associated with high grain protein content in wheat relatives has enhanced the significance of distant hybridization for the nutritional value of *T. aestivum* L. grain. In this work we aimed to study the allelic polymorphism of the *NAM-A1* and *NAM-B1* genes in wheat introgression lines and their parental forms and evaluate the effects of various *NAM-1* variants on the grain protein content and productivity traits in the field conditions of Belarus. We studied parental varieties of spring common wheat, the accessions of tetraploid and hexaploid species of the genus *Triticum* and 22 introgression lines obtained using them (2017–2021 vegetation periods). Full-length *NAM-A1* nucleotide sequences of *T. dicoccoides* k-5199, *T. dicoccum* k-45926, *T. kiharae*, and *T. spelta* k-1731 accessions

were established and registered with the international molecular database GenBank. Six combinations of *NAM-A1/B1* alleles were identified in the accessions studied and their frequency of occurrence varied from 40 to 3 %. The cumulative contribution of *NAM-A1* and *NAM-B1* genes to the variability of economically important wheat traits ranged from 8–10 % (grain weight per plant and thousand kernel weight) to up to 72 % (grain protein content). For most of the traits studied, the proportion of variability determined by weather conditions was small (1.57–18.48 %). It was shown that, regardless of weather conditions, the presence of a functional *NAM-B1* allele ensures a high level of grain protein content; at the same time, it does not significantly decrease thousand kernel weight. The genotypes combining the *NAM-A1d* haplotype and a functional *NAM-B1* allele demonstrated high levels of productivity and grain protein content. The results obtained demonstrate the effective introgression of a functional *NAM-B1* allele of related species increasing the nutritional value of common wheat.

Key words: common wheat; wheat relatives; wheat introgressive lines; *NAM-1* genes; grain protein content; productivity.

For citation: Orlovskaya O.A., Vakula S.I., Yatsevich K.K., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Effect of *NAM-1* genes on the protein content in grain and productivity indices in common wheat lines with foreign genetic material introgressions in the conditions of Belarus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3): 197-206. DOI 10.18699/VJGB-23-26

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важная сельскохозяйственная культура, играющая ключевую роль в обеспечении продовольствием населения во всем мире. Одним из приоритетных направлений селекции пшеницы является повышение качества зерна, которое в первую очередь определяется общим содержанием белка (Brevin et al., 2010). Сложная полигенная природа признака «содержание белка в зерне», изменчивость его под действием внешних факторов, а также отрицательная корреляция между содержанием белка и продуктивностью усложняют селекцию (Iqbal et al., 2016). Кроме того, низкое генетическое разнообразие современных сортов по признаку ограничивает их использование в селекционных программах по улучшению питательной ценности пшеницы. Многие родственные виды *T. aestivum* характеризуются более высоким количеством белка в зерне по сравнению с культивируемыми сортами (Peleg et al., 2008; Kumar et al., 2019).

Новые возможности для селекции на повышение суммарного белка в зерне появились с обнаружением у дикорастущей полбы *T. dicoccoides* (геном AABB) локуса *Gpc-B1*, ассоциированного с содержанием белка. Локус был картирован в коротком плече хромосомы 6B, а при детальном уточнении границ участка его локализации была найдена последовательность, идентифицированная как ген *NAM-B1*, принадлежащий к семейству NAC-факторов транскрипции (Uauy et al., 2006a). Гены данного семейства участвуют в регуляции различных программ развития растений, контроле защитных реакций на биотические и абиотические стрессоры, играют важную роль в процессе старения растений (Puranik et al., 2012; Zhao et al., 2015). В дополнение к гену *NAM-B1* мягкая пшеница имеет также гомеологичные гены *NAM-A1* и *NAM-D1* в хромосомах 6A и 6D (Avni et al., 2014).

У дикорастущей полбы обнаружен функциональный аллель *NAM-B1* (аллель дикого типа), обеспечивающий высокое содержание белка в зерне. Этот аллель включает три экзона и два интрона и кодирует белок из 407 аминокислотных остатков, который имеет консервативный N-концевой участок, или NAC-домен с пятью субдоменами, и сильно изменчивый C-концевой участок активации транскрипции (Waters et al., 2009). Функциональный аллель *NAM-B1* не встречается у большинства современных

сорт пшеницы. Сорта, как правило, имеют инсерцию 1 п. н. в первом экзоне, приводящую к сдвигу рамки считывания (мутантный аллель), или делецию гена (частичную или полную), и как следствие, – неактивный белок или его отсутствие (Uauy et al., 2006b). Так, изучение 218 сортов пшеницы из пяти основных регионов Китая не выявило ни одного сорта с функциональным аллелем гена *NAM-B1* (Chen et al., 2017). Молекулярная характеристика генов *NAM-1* австралийских сортов мягкой пшеницы показала наличие дикого аллеля гена *NAM-B1* только у 2 сортов из 51 (Yang et al., 2018).

Установлено, что ген *NAM-A1*, как и *NAM-B1*, состоит из трех экзонов, обладает типичными характеристиками генов NAC-семейства и участвует в регуляции тех же процессов, что и *NAM-B1*. В результате анализа связи однонуклеотидных вариантов (SNP) гена *NAM-A1* с ремобилизацией азота из листьев и накоплением белка в зерне обнаружены две функциональные однонуклеотидные замены: в позиции 722 (T/C) и в позиции 1509 (A/del). На основании полученных данных предложена классификация гаплотипов гена *NAM-A1*: *NAM-A1a* (722C и 1509A), *NAM-A1b* (722C и 1509del), *NAM-A1c* (722T и 1509A), *NAM-A1d* (722T и 1509del) (Cormier et al., 2015).

Отсутствие у современных сортов пшеницы функционального аллеля *NAM-B1*, обеспечивающего высокое содержание белка в зерне в различных экологических условиях, упрочило позиции отдаленной гибридизации для повышения питательной ценности зерна пшеницы. С целью обогащения и улучшения генофонда мягкой пшеницы в скрещиваниях с сортами *T. aestivum* L. нами были привлечены образцы видов рода *Triticum* (*T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. kiharae*). Проведенное ранее изучение генетического разнообразия коллекции интрогрессивных линий пшеницы с помощью методов С-бэндинга и SSR-анализа показало, что в геноме гибридных линий чужеродный генетический материал представлен в виде как небольших участков, так и целых хромосом (Orlovskaya et al., 2016, 2020).

Цель настоящей работы – изучение аллельного состава генов *NAM-A1* и *NAM-B1* у интрогрессивных линий пшеницы и их родительских форм и оценка эффекта различных вариантов генов *NAM-1* на содержание белка в зерне и признаки продуктивности пшеницы в полевых условиях Беларуси.

Материалы и методы

В исследование включены пять сортов яровой мягкой пшеницы (Рассвет, Саратовская 29, Фестивальная, Белорусская 80, Pitic S62), тетраплоидные *T. dicoccoides*, *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccum* к-45926, *T. durum* и гексаплоидные *T. spelta* к-1731, *T. kiharae* образцы видов рода *Triticum*, а также полученные нами 22 интрогрессивные линии (Приложение 1)¹. Образцы чужеродных доноров представлены из коллекции ВИР, информация о родословных отдельных образцов не сохранилась (номера по каталогу ВИР не указаны).

Растения выращивали на экспериментальных полях Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2017–2021 гг. (г. Минск) на дерново-подзолистой супесчаной почве. Характеристика погодных условий в регионе исследования в 2017–2021 гг. приведена в Приложении 2. Данные о среднесуточных температурах и количестве выпавших осадков (<http://tr5.by>) использованы для расчета суммы активных температур (САТ) и гидротермического коэффициента Селянинова (ГТК) (Мамонтова, Хромов, 1974). При уборке проводили учет следующих признаков: «высота растения», «количество продуктивных побегов на растение», «длина главного колоса», «число колосков и зерен главного колоса», «масса зерна с колоса и растения», а также «масса 1000 зерен». Для оценки признаков случайным образом отбирали 15 растений каждого генотипа.

Для секвенирования последовательностей полногеномного гена *NAM-A1* и первого экзона *NAM-B1* использовали специфичные праймеры, разработанные R. Yang с коллегами (2018). Реакцию секвенирования проводили с помощью набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США), разделение продуктов секвенирующей реакции – на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и анализ гомологии выполняли на анализаторе BLAST Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). В качестве референсной последовательности был сорт Chinense Spring, который, согласно литературным данным, имеет гаплотип *NAM-A1a* (722С и 1509А) и мутантный аллель *NAM-B1* (инсерция Т в положении +11) (Yang et al., 2018).

Общее содержание белка в зерне пшеницы определяли в соответствии с ГОСТ 10846-91 (2009) в Центральной республиканской лаборатории ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений» (г. Минск, РБ). Сущность метода заключается в минерализации органического вещества серной кислотой в присутствии катализатора с образованием сульфата аммония, разрушении сульфата аммония щелочью с выделением аммиака, отгонке аммиака водяным паром в раствор серной или борной кислоты с последующим титрованием.

Результаты эксперимента обобщены с применением методов описательной статистики, двухфакторного дисперсионного, регрессионного, корреляционного анализов (использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена). Статистические процедуры реализованы в программных пакетах Statistica 10.0, MS Excel, веб-при-

ложении SNPstats. Количественный вклад отдельных факторов дисперсионного анализа рассчитывали на основе отношения абсолютной дисперсии фактора к сумме дисперсий этого и остальных факторов, согласно формулам, приведенным в работе (Рокицкий, 1973).

Результаты

Аллельный полиморфизм генов *NAM-A1* и *NAM-B1*

Проведено секвенирование полногеномного гена *NAM-A1* у родительских сортов и образцов видов рода *Triticum*, у 22 интрогрессивных линий, созданных на их основе. Среди родительских форм гаплотип *NAM-A1a* выявлен у сортов: Фестивальная, Рассвет, образцов: *T. durum*, *T. dicoccum* к-45926, *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccoides*, *T. kiharae*; гаплотип *NAM-A1c* – у *T. spelta* к-1731; гаплотип *NAM-A1d* – у сортов: Саратовская 29, Белорусская 80, Pitic S62 (Приложение 3).

Сравнительный анализ показал, что нуклеотидные последовательности *NAM-A1a* образцов *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccoides*, *T. kiharae* не имели 100 % сходства с последовательностью *NAM-A1a T. aestivum* (MH160778) из базы данных GeneBank. Последовательности образцов дикой полбы (*T. dicoccoides* к-5199 и *T. dicoccoides*), исследованные нами, отличались от *NAM-A1a T. aestivum* (MH160778) двумя SNP: позиции 538 п. н. (С/А в экзоне 2) и 1139 п. н. (G/Т в экзоне 3) (уровень идентичности – 99.9 %). SNP 1139 п. н. G/Т приводит к замене аспарагина на тирозин в аминокислотной последовательности белка. Уровень сходства *NAM-A1a* образца *T. kiharae* с *NAM-A1a* из базы данных GeneBank (MH160778) составил 99.7 % и отличался от него по шести SNP: в позициях: 189 п. н. (С/А в экзоне 1), 306 п. н. (А/С в интроне 1), 1133 п. н. (G/А в экзоне 3), 1271 п. н. (G/Т в экзоне 3), 1414 п. н. (C/G в экзоне 3), 1491 п. н. (G/С в экзоне 3). Три из данных SNP вызывают изменения в аминокислотной последовательности белка: замена G/А в позиции 1133 п. н. приводит к замене аланина на треонин; G/Т в позиции 1271 п. н. – аланина на серин; G/С в позиции 1491 п. н. – глицина на аланин.

Последовательность гена *NAM-A1* образцов *T. dicoccum* к-45926 и *T. durum* была полностью гомологична последовательности аллеля *NAM-A1a* (GenBank: MH160778), последовательность *NAM-A1* образца *T. spelta* к-1731 соответствовала аллелю *NAM-A1c* (GenBank: MH160777). Нуклеотидные последовательности гена *NAM-A1* образцов *T. kiharae*, *T. spelta* к-1731, *T. dicoccoides* к-5199 и *T. dicoccum* к-45926, впервые описанные нами, были зарегистрированы в международной базе данных GenBank (коды доступа MT572492, MT920417, MW384855, MW384856 соответственно).

Анализ данных секвенирования гена *NAM-A1* у интрогрессивных линий пшеницы показал, что 54.6 % линий имели гаплотип *NAM-A1d*; 36.4 % – гаплотип *NAM-A1a* и 9.1 % – гаплотип *NAM-A1c*. Можно отметить, что линии пшеницы с чужеродным генетическим материалом, как правило, наследовали ген *NAM-A1* исходного сорта пшеницы, но был и ряд исключений (см. Приложение 3). Гаплотип, соответствующий родственному виду, был выявлен у линий, созданных с участием *T. spelta* к-1731 (линии 1-8 и 7, *NAM-A1c*), у линии 226-7 *T. durum* × Бело-

¹ Приложения 1–8 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx8.pdf>

русская 80 (*NAM-A1a*), у линии 20-1 *T. kiharae* × Саратовская 29 (*NAM-A1a*). Среди линий, созданных с участием *T. dicoccoides*, только линии 11-1 и 13-3, полученные в результате скрещивания с сортом Фестивальная, унаследовали ген *NAM-A1* от дикой полбы с характерными только для нее SNP в позициях 538 и 1139 п. н. нуклеотидной последовательности гена.

Анализ секвенограмм первого экзона гена *NAM-B1* у изученных генотипов выявил функциональный аллель (*F*) у всех образцов видов-сородичей, за исключением *T. durum*, для которого не определили аллель *NAM-B1*, и у 5 из 22 интрогрессивных линий пшеницы (13-3 и 15-7-1 от комбинации *T. dicoccoides* × Фестивальная, 19 и 25-2 – от *T. kiharae* × Саратовская 29 и линии 7 из комбинации *T. spelta* к-1731 × Саратовская 29). Все родительские сорта и большая часть линий пшеницы с чужеродным генетическим материалом (77.3 %) имели мутантный аллель (*NF*).

Эффекты генов *NAM-A1* и *NAM-B1* на признаки продуктивности и содержание белка в зерне

Результаты генотипирования интрогрессивных линий мягкой пшеницы и родительских форм по генам *NAM-A1* и *NAM-B1* сопоставлены с результатами полевых испытаний и данными содержания белка в зерне 2017–2021 гг. Оценку влияния генотипа, факторов внешней среды и их взаимодействия определяли с использованием общей линейной модели (GLM) двухфакторного дисперсионного анализа (Приложение 4).

Сочетание генов *NAM-A1/B1* оказывает статистически значимое влияние на проявление всех девяти изученных признаков, при этом превышая вклад отдельных генов *NAM-1* в изменчивость содержания белка, высоты растения, числа колосков в колосе и массы 1000 зерен (см. Приложения 4 и 5). Ген *NAM-B1* не оказывает значимого влияния на длину колоса пшеницы, вместе с тем *NAM-A1* или комбинация *NAM-A1/B1* обуславливают более половины наблюдаемой вариации признака.

Наибольшая длина главного колоса относительно других гаплотипов характерна для растений *NAM-A1c* (в среднем за пять лет наблюдений – 9.86 см), а при сочетании *c/F* этот показатель возрастает до 10.87 см. Эффект, оказываемый аллельными вариантами *NAM-B1* на изменчивость числа и массы зерен в колосе, почти в три раза превышает влияние гаплотипов *NAM-A1* и в полтора раза – сочетание *NAM-A1* и *NAM-B1*.

Продуктивность колоса в группе образцов с диким аллелем *NAM-B1* была значимо меньше, чем у генотипов с мутантным аллелем (Приложение 6). Так, в колосе большинства генотипов с функциональным аллелем (7 из 10) число зерен не достигало 30 шт., в то время как в колосе генотипов с мутантным аллелем, как правило, формировалось 30–40 зерен. Можно отметить значительную вариацию признаков продуктивности колоса в обеих группах. Отдельные генотипы с функциональным аллелем характеризовались высокими показателями по данным признакам (линии 19 *T. kiharae* × Саратовская 29 (*d/F*) и 15-7-1 *T. dicoccoides* × Фестивальная (*a/F*)). Во всех трех вариантах дисперсионного анализа масса 1000 зерен и масса зерен с растения – это признаки с низким (до 10 %) вкладом генетических вариантов, при этом масса зе-

рен с растения статистически не зависима от гаплотипа *NAM-A1*, а масса 1000 зерен – от аллеля *NAM-B1*. Изменчивость содержания белка в зерне на 70 % связана с полиморфизмом *NAM-B1*, вклад *NAM-A1* существенно ниже и немного возрастает при рассмотрении сочетания аллелей двух генов (см. Приложение 5). Так, в среднем за четыре года в группах с различными гаплотипами *NAM-A1* наибольшее содержание белка в зерне у генотипов *NAM-A1a* (21.53 %), в группах с различными вариантами *NAM-B1* – с функциональным аллелем *NAM-B1* (22.53 %), а при сочетании *a/F* отмечено максимальное количество белка (23.72 %) (Приложение 7).

Силу и направление связи между различными аллелями генов *NAM-1* и хозяйственно важными признаками оценили с использованием коэффициента корреляции Спирмена (табл. 1).

Выявлена связь средней силы между содержанием белка в зерне и аллельными вариантами генов *NAM-1*, однако статистически достоверна только корреляция с *NAM-B1* (см. табл. 1). Кроме того, значимая зависимость установлена между аллельными вариантами *NAM-B1* и продуктивной кустистостью, числом и массой зерен с колоса. Гаплотип *NAM-A1* достоверно коррелировал только с длиной колоса, с остальными признаками продуктивности ассоциация была слабая. Результаты дисперсионного анализа также показали, что аллельные варианты *NAM-B1* оказывают значительно большее влияние на изменчивость содержания белка в зерне, числа и массы зерен в колосе, продуктивной кустистости, чем варианты *NAM-A1* (см. Приложение 5). Необходимо отметить, что дисперсионный и корреляционный анализы установили невысокую связь генов *NAM-1* с признаками «высота растения», «число колосков в колосе», «масса зерен с растения» и «масса 1000 зерен» (см. Приложение 5, табл. 1).

Всего в исследуемой выборке выявлено шесть комбинаций аллелей *NAM-A1/B1*, частоты встречаемости которых варьировали от 40 (*d/NF*) до 3 % (*c/NF*). Некоторые комбинации аллелей представлены небольшим количеством образцов (*d/F*, *c/F* и *c/NF*), поэтому нельзя говорить о достоверно значимом различии признаков у растений с данными комбинациями аллелей.

Средние значения признаков продуктивности генотипов, несущих различные комбинации генов *NAM-A1/B1*, представлены в табл. 2.

Генотипы, сочетающие разные гаплотипы *NAM-A1* с функциональным аллелем *NAM-B1*, имели большую высоту и продуктивную кустистость, чем растения с соответствующим гаплотипом в сочетании с мутантным аллелем *NAM-B1* (см. табл. 2). Максимальные значения для этих признаков характерны для образцов *c/F* – 93.36 см и 3.86 шт. Для признаков продуктивности колоса обнаружена противоположная тенденция: все три гаплотипа *NAM-A1* в комбинации с функциональным аллелем *NAM-B1* обладали низкими числом и массой зерен с колоса (см. табл. 2). Образцы с гаплотипами *NAM-A1a* и *NAM-A1c* в сочетании с функциональным аллелем показали незначительное уменьшение массы 1000 зерен по сравнению с генотипами, сочетающими *NAM-A1a* и *NAM-A1c* с мутантным аллелем (см. табл. 2).

Таблица 1. Коэффициенты корреляции Спирмена между аллельными вариантами генов *NAM-A1*, *NAM-B1* и хозяйственно важными признаками исследованных генотипов пшеницы

Ген	ВР	ПК	ДК	ЧКК	ЧЗК	МЗК	МЗР	М1000	Содержание белка
<i>NAM-A1</i>	-0.008	0.01	0.67*	0.06	0.08	0.22	0.20	0.18	0.43*
<i>NAM-B1</i>	0.33	0.53*	-0.16	-0.17	-0.44*	-0.47*	-0.18	-0.06	0.57*

Примечание. ВР – высота растения; ПК – продуктивная кустистость; ДК – длина колоса; ЧКК – число колосков в колосе; ЧЗК – число зерен с колоса; МЗК – масса зерен с колоса; МЗР – масса зерен с растения; М1000 – масса 1000 зерен. * Достоверно при $p < 0.05$.

Таблица 2. Средние значения признаков продуктивности и содержания белка в зерне в группах генотипов пшеницы с различными сочетаниями аллелей генов *NAM-1*

Аллели генов <i>NAM-1</i>	<i>d/NF</i>	<i>a/NF</i>	<i>a/F</i>	<i>d/F</i>	<i>c/F</i>	<i>c/NF</i>
Частота встречаемости комбинации аллелей, %	40	30	13	7	7	3
Признак	$\bar{X} \pm \text{SEM}$					
Высота растения, см	76.19 ± 0.42	78.79 ± 0.57	79.93 ± 0.77	81.73 ± 1.09	93.36 ± 1.54	82.95 ± 1.79
Продуктивная кустистость, шт.	2.89 ± 0.02	2.97 ± 0.03	3.29 ± 0.05	3.11 ± 0.07	3.86 ± 0.09	3.19 ± 0.09
Длина колоса, см	9.46 ± 0.04	8.82 ± 0.05	7.87 ± 0.10	10.17 ± 0.09	10.75 ± 0.19	8.78 ± 0.11
Число колосков в колосе, шт.	16.41 ± 0.08	16.27 ± 0.09	15.86 ± 0.20	14.58 ± 0.22	15.13 ± 0.20	15.32 ± 0.25
Число зерен с колоса, шт.	35.55 ± 0.30	35.36 ± 0.37	28.60 ± 0.60	28.78 ± 0.78	27.84 ± 0.55	28.83 ± 0.64
Масса зерна с колоса, г	1.43 ± 0.01	1.38 ± 0.02	1.07 ± 0.03	1.27 ± 0.04	1.08 ± 0.03	1.18 ± 0.03
Масса зерна с растения, г	3.12 ± 0.04	3.14 ± 0.05	2.64 ± 0.07	2.93 ± 0.10	3.11 ± 0.10	2.90 ± 0.10
Масса 1000 зерен, г	40.20 ± 0.23	38.93 ± 0.33	37.97 ± 0.50	44.34 ± 0.54	39.12 ± 0.68	41.25 ± 0.72
Содержание белка, %	19.14 ± 0.2	20.07 ± 0.2	23.72 ± 0.3	21.37 ± 0.4	19.77 ± 0.2	19.14 ± 0.4

Примечание. *a* – гаплотип *NAM-A1a*; *d* – гаплотип *NAM-A1d*; *c* – гаплотип *NAM-A1c*; *F* – функциональный аллель *NAM-B1*; *NF* – мутантный аллель *NAM-B1*; $\bar{X}$ – средние значения признаков; SEM – стандартная ошибка среднего.

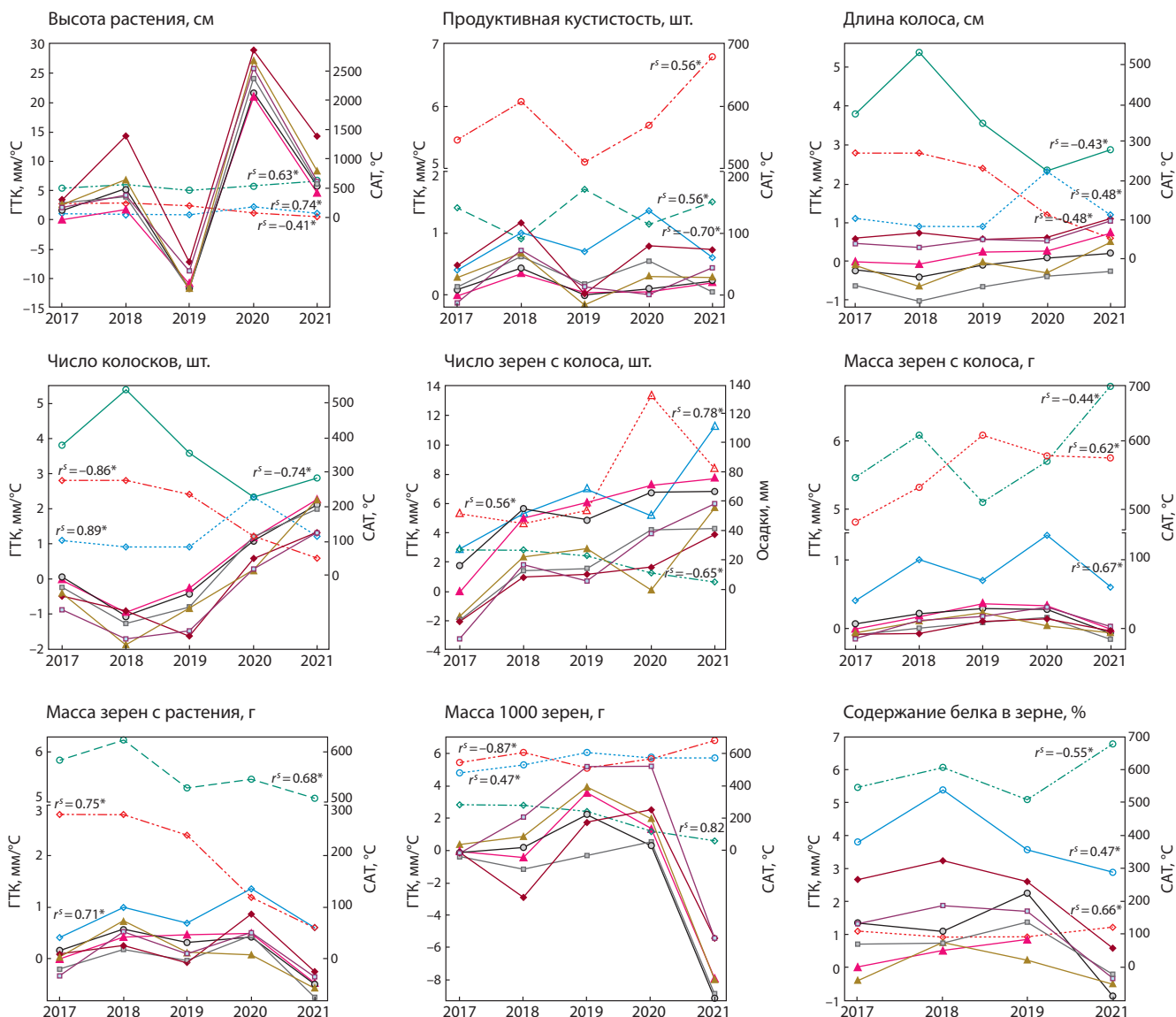
Для растений с гаплотипом *NAM-A1d* выявлено увеличение массы 1000 зерен в группе с функциональным аллелем (40.20 г – у генотипов *d/NF* и 44.34 г – у генотипов *d/F*). Можно отметить, что образцы с *NAM-A1a* были наименее продуктивны по данному признаку как в группе с функциональным (37.97 г), так и нефункциональным (38.93 г) аллелями *NAM-B1*. Наличие мутантного аллеля гена *NAM-B1* приводит к снижению содержания белка относительно комбинации с функциональным аллелем: для гаплотипов *NAM-A1a* в среднем на 3.6 %, *NAM-A1d* – на 2.3 % и *NAM-A1c* – на 0.6 % (в последнем случае снижение статистически незначимо). Максимальное количество белка в зерне накапливали линии с комбинацией *a/F*, минимальное – с *d/NF* и *c/NF* (см. табл. 2).

Роль погодных условий и их взаимодействие с генами *NAM-1* в изменчивости признаков продуктивности и содержания белка в зерне

Вне зависимости от используемой модели (*NAM-A1* × погодные условия, *NAM-B1* × погодные условия, *NAM-A1/B1* × погодные условия) для всех признаков показана высокая статистическая значимость вклада погодных условий года выращивания, однако преобладание роли данного фактора (> 50.0 %) установлено только в изменчивости признаков «высота растения» и «число колосков в колосе». Взаимодействие комбинации генов *NAM-A1/B1* с погодными

условиями значимо влияет на все показатели продуктивности пшеницы. Особенно высок вклад этого взаимодействия (более 60 %) в дисперсию признаков «масса зерен с колоса и растения», «масса 1000 зерен», «продуктивная кустистость». Влияние взаимодействия «*NAM-B1* × погодные условия» на признаки продуктивности ниже, чем вклад других факторов (см. Приложение 5). Исключение составляет только признак «число колосков в колосе», для которого вклад генотип-средовых взаимодействий с *NAM-B1* составляет 3 %, а с *NAM-A1* он статистически незначим ($p = 0.23$). Следует отметить отсутствие влияния на содержание белка в зерне взаимодействия погодных условий и всех трех генетических факторов.

Различные генотипы могут по-разному реагировать на изменения условий среды. Аддитивность эффектов *NAM-A1/B1* и погодных условий на проявление исследованных признаков тестировали с использованием лог-аддитивной модели линейной регрессии веб-приложения SNPstats. Для признаков «высота растения», «продуктивная кустистость», «число колосков в колосе», «масса зерен с растения» и «масса 1000 зерен» установлено взаимное усиление эффектов двух факторов: аллелей *NAM-A1/B1* и погодных условий. Аддитивное взаимодействие генотипа *NAM-A1/B1* и среды статистически незначимо для изменчивости признаков «длина колоса», «число и масса зерен в главном колосе», «содержание белка».



Разница между значениями признаков продуктивности растений пшеницы с комбинацией *d/NF* в 2017 г. и другими сочетаниями аллелей *NAM-A1/B1* в погодно-климатических условиях Беларуси 2017–2021 гг. (результаты SNPStats).

Комбинации аллелей *NAM-A1/B1*: ▲ *d/NF*; ○ *a/NF*; □ *a/F*; ◆ *c/F*; ▲ *d/F*; □ *c/NF*. Условия среды: ○ CAT – сумма активных температур; ◇ ГТК – гидротермический коэффициент; Δ – осадки. Этапы вегетации: — май; июнь; июль; ---- август; r^s – коэффициент ранговой корреляции Спирмена, который показывает силу связи между признаками продуктивности и метеопараметрами.

Изменчивость изученных признаков генотипов, несущих различные комбинации *NAM-A1/B1*, в условиях различных вегетационных периодов оценивали относительно продуктивности растений с аллелями *d/NF* в 2017 г. (см. рисунок). Для поиска метеорологических факторов, обуславливающих генотип-средовое взаимодействие, проведены: 1) сравнительный анализ ранжирования аллельных комбинаций в условиях 2017–2021 гг., 2) корреляционный анализ признаков продуктивности с метеопараметрами (см. рисунок).

Анализ коэффициентов корреляции показал, что на большинство изученных признаков значительное влияние оказали погодные условия во время фазы налива зерна – ГТК и САТ в июле. Наиболее тесная ассоциация выявлена между ГТК июля и высотой растения, числом колосков

в колосе, массой зерен с растения и массой 1000 зерен (см. рисунок). Во время фазы налива зерна происходит усиленное поступление минеральных и органических веществ в зерно пшеницы; неблагоприятные условия в данный период существенно ухудшают его качество и снижают урожайность. Оптимальный ГТК июля (1.2) характерен для сезона 2020 г. В июле 2021 г. наблюдались превышение температуры воздуха и недостаток осадков по сравнению с нормой, и ГТК составил всего 0.4, что характеризует данный период как засушливый. В остальные годы ГТК июля значительно превышал норму и составил 2.8, 2.8 и 2.4 в 2017, 2018, 2019 гг. соответственно.

Можно отметить, что температура воздуха и количество осадков на протяжении всего вегетационного периода 2020 г. были близки к климатической норме, что способ-

ствовало максимальной реализации продуктивности пшеницы (Приложение 8). Условия 2021 г. (переувлажнение почв в мае, засуха в июле, дожди в период созревания зерна и уборки урожая) привели к существенному снижению показателей урожайности исследуемых генотипов (см. Приложение 8).

«Высота растений» – признак с аддитивным вкладом генов *NAM-1* и погодных условий. Наличие функционального аллеля *NAM-B1* и гаплотипа *NAM-A1c* ассоциировано со статистически значимым ростом соломины. Обеспеченное увлажнение почв ($ГТК > 1$) на протяжении периода «выход в трубку–цветение» стимулирует рост растений, в то же время избыточное количество осадков в июле–августе, напротив, негативно сказывается на высоте растения. Например, средняя высота растений пшеницы в 2019 г. (холодное и сырое лето) снизилась на 10.6–14.5 см, а в близком к климатической норме 2020 г. – увеличилась более чем на 20 см относительно значений 2017 г. Растения с гаплотипом *NAM-A1c* наименее чувствительны к средовым факторам, снижающим высоту стебля, при этом в благоприятных условиях прирост соломины достигает 10–25 см.

Показано, что на продуктивную кустистость растений отрицательно влияют переувлажнение почвы и большое количество осадков в августе, что связано с торможением процессов вторичного роста, полеганием и нарушением газообмена корневой системы. С признаком положительно коррелируют ГТК мая и САТ июля, т.е. отсутствие заморозков и засухи на стадии кущения и высокая интенсивность фотосинтеза на этапе созревания. Растения с функциональным аллелем *NAM-B1* в благоприятных условиях формируют больше стеблей и значимо снижают кустистость в условиях весенней засухи (см. рисунок).

Модели SNPstats не смогли объяснить изменчивость длины колоса ни аддитивным взаимодействием аллелей *NAM-A1* и *NAM-B1*, ни взаимодействием генетических факторов и условий выращивания. Как на длину колоса, так и на число колосков в колосе оказывают влияние условия, наблюдаемые на этапах выхода в трубку и колошения, а именно – ГТК в июне. Теплые и засушливые условия мая–июня 2018 г. сопровождалось снижением средней длины и числа колосков в колосе, однако для позднеспелых генотипов с комбинацией *c/F* снижение числа колосков оказалось статистически незначимым. Число и масса зерен в главном колосе зависят от оптимальных условий увлажнения на этапе всходов и кущения, суммы активных температур на этапе колошения и цветения. Невысокий урожай главного колоса отмечен в условиях 2017 и 2021 гг., характеризовавшихся низким гидротермическим коэффициентом мая, но различавшихся по температурному и гидрологическому режиму на последующих этапах вегетационного периода. В 2021 г. отмечено максимальное число формируемых в главном колосе зерен, в 2017 г. – минимальное (см. рисунок).

Масса зерен с растения и масса 1000 зерен – наиболее важные показатели урожайности пшеницы. При достоверной разнице средних значений признаков у растений, несущих варианты комбинации генов *NAM-A1/B1*, аддитивного влияния генетические факторы не оказывают. Вне зависимости от года выращивания комбинации гап-

лотипов *NAM-A1a* и *NAM-A1c* с функциональным вариантом *NAM-B1* ассоциированы с незначительным снижением массы 1000 зерен относительно комбинаций с нефункциональным вариантом гена. Между генотипами *d/F* и *d/NF* существенных различий по признакам семенной продуктивности не обнаружено (см. рисунок). Позднеспелые генотипы, несущие гаплотип *NAM-A1c*, дают существенный прирост массы 1000 зерен при сочетании высоких ГТК в июле и августе, что наблюдалось в 2019–2020 гг. (см. рисунок).

Для формирования зерна растения пшеницы ремобилизуют азот и углеводы из флагового листа, в связи с чем содержание белка в зерне зависит от интенсивности фотосинтеза и площади фотосинтетической поверхности (Lawlor et al., 1989). Высокий ГТК июня может оказывать негативное влияние на содержание белка через снижение этих параметров – низкая солнечная инсоляция вследствие высокой облачности и рост площади поражения листовой пластинки фитопатогенами в условиях высокой влажности. В неблагоприятных для общей продуктивности условиях 2021 г. растения с функциональным аллелем *NAM-B1* накапливали больше белка, чем генотипы с мутантным вариантом гена (см. рисунок).

Обсуждение

Изученные нами сорта мягкой пшеницы имели гаплотип *NAM-A1d* или *NAM-A1a*, мутантный аллель *NAM-B1*, что согласуется с данными литературы. Например, в коллекции австралийских сортов пшеницы чаще всего встречались образцы с гаплотипами *NAM-A1a* (50.1 %) и *NAM-A1d* (28 %), реже – *NAM-A1b* (1.9 %) (Yang et al., 2018). F. Cormier с коллегами (2015) в своих исследованиях выявили, что для большинства современных европейских сортов пшеницы характерен именно гаплотип *NAM-A1d*, в то время как *NAM-A1a* наиболее часто встречается у сортов с высокими хлебопекарными свойствами. Образцов пшеницы с гаплотипом *NAM-A1b* в исследованной нами коллекции не обнаружено. В работах зарубежных ученых приводятся данные о низкой частоте встречаемости этого гаплотипа. Например, в коллекции из 795 образцов пшеницы обнаружен только один образец с *NAM-A1b*. Существует предположение, что этот гаплотип появился недавно в результате рекомбинации между *NAM-A1a* и *NAM-A1d* (Cormier et al., 2015).

Наличие функциональных аллелей *NAM-B1* только у сородичей пшеницы среди исследованных нами родительских форм подтверждается данными других исследователей. Так, в работе С. Uauy с коллегами (2006b) функциональный аллель *NAM-B1* обнаружен у всех проанализированных 42 образцов *T. dicoccoides* и у 17 из 19 образцов *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., в то время как все 57 изученных сортов твердой пшеницы и 34 сорта мягкой пшеницы или содержали инсерцию 1 п. н., или имели делецию гена. Среди 367 образцов мягкой пшеницы стержневой коллекции INRA (Франция), отобранных из 3942 генотипов различного географического происхождения, только 5 содержали функциональные аллели *NAM-B1* (Hagenblad et al., 2012). В связи с тем, что культивируемые в настоящее время сорта, как правило, не имеют функционального аллеля *NAM-B1*, полученные

нами пять интрогрессивных линий пшеницы с данным аллелем представляют большой интерес для повышения качества зерна пшеницы.

Анализ различий средних значений количественных признаков в группах, несущих разные гаплотипы *NAM-A1*, выявил, что во все годы эксперимента растения *NAM-A1a* имели короткий колос, низкие массу зерен с растения и массу 1000 зерен, высокое содержание белка в зерне; *NAM-A1c* – максимальные высоту растения, продуктивную кустистость и длину колоса, но низкие показатели озерненности и массы семян с колоса; *NAM-A1d* – минимальные высоту растения, количество продуктивных побегов и максимальные значения признаков продуктивности колоса и растения. В ряде работ показано, что присутствие гаплотипа *NAM-A1a* связано с более коротким периодом налива зерна и более интенсивным процессом ремобилизации азота, что вызывает повышенную белковость, но снижение числа зерен в колосе и массы 1000 зерен, в то время как наличие *NAM-A1c* или *NAM-A1d* приводит к увеличению периода налива зерна, в результате которого возрастают количество поглощенного азота и урожайность пшеницы (Cormier et al., 2015; Alhabbar et al., 2018). Существует предположение, что *NAM-A1a* является функциональным вариантом гена *NAM-A1*, редко встречающегося у элитных современных сортов пшеницы, селекция которых велась главным образом на продуктивность.

Полученные нами данные о высоком уровне накопления белка в зерне у генотипов пшеницы с диким аллелем *NAM-B1* совпадают с результатами многих зарубежных ученых. Изучение серии почти изогенных линий на основе мягкой и твердой пшеницы в разных странах мира (США, Аргентина, Индия, Китай, Австралия и др.) позволило сделать вывод, что интрогрессия функционального аллеля *NAM-B1* в геном культурных пшениц обоих уровней плоидности приводит к повышению содержания белка и ключевых минералов в зерне, улучшению уборочного индекса азота, увеличению сбора белка (Tabbitta et al., 2013; Maphosa et al., 2014; Mishra et al., 2015; Kuhn et al., 2016).

На протяжении всего периода наблюдений генотипы с функциональным аллелем *NAM-B1* характеризовались большей высотой растения и продуктивной кустистостью, но более низкими показателями по признакам продуктивности колоса и растения по сравнению с генотипами, несущими нефункциональный аллель. Однако нами не обнаружено достоверного влияния аллельного состояния *NAM-B1* на массу 1000 зерен. В литературе встречаются сведения как о положительном, так и отрицательном эффекте аллеля дикого типа *NAM-B1* на основные компоненты продуктивности пшеницы (Carter et al., 2012; Maphosa et al., 2014; Kuhn et al., 2016). Значимое увеличение продуктивных стеблей у линий мягкой пшеницы с функциональным аллелем *NAM-B1*, установленное нами, показано также в работах других ученых (Tabbitta et al., 2013; Vishwakarma et al., 2016).

Известно, что на продуктивную кустистость оказывают влияние многие факторы окружающей среды, включая доступность азота (Wang, Below, 1996). Возможно, функциональный аллель *NAM-B1* способствует формированию продуктивных стеблей благодаря тому, что

влияет на улучшение метаболизма азота (Tabbitta et al., 2013). Согласно обзорной статье, в которой обобщены данные 25 работ по изучению влияния аллельных вариантов гена *NAM-B1* на 50 признаков пшеницы, 36 % исследований не показали значимых различий по массе 1000 зерен между генотипами с различными вариантами аллеля данного гена, соответственно, 23 и 41 % выявили существенное снижение и увеличение этого показателя у линий с функциональным аллелем. Следует отметить, что в большей части исследований (79 %) не установлено статистически значимого влияния полиморфизма *NAM-B1* на урожайность пшеницы и только в 4 % исследований продемонстрировано снижение урожайности у линий с функциональным аллелем (Tabbitta et al., 2017). Такой факт объясняют положительным влиянием функционального аллеля на формирование продуктивных стеблей, так как именно благодаря высокой продуктивной кустистости не происходит существенного снижения урожайности зерна, даже несмотря на низкую продуктивность колоса (Tabbitta et al., 2013).

Оценка эффекта шести комбинаций аллелей *NAM-A1/B1* на уровень проявления ряда хозяйственно полезных признаков пшеницы показала, что максимальная высота и продуктивная кустистость характерны для генотипов *c/F*, высокая продуктивность колоса и растения – для *d/NF*, наибольшая концентрация белка в зерне – для *a/F* (см. табл. 2). Похожие результаты представлены в работе (Alhabbar et al., 2018) по изучению влияния аллельного состава генов *NAM-1* на эффективность использования азота, продуктивность и содержание белка в зерне пшеницы. В данном исследовании сорт Маса, имеющий нефункциональный аллель *NAM-B1* и гаплотип *NAM-A1d*, значимо превосходил остальные генотипы по урожайности, но содержал минимальное содержание белка в зерне. Сорта, сочетающие функциональный аллель с различными гаплотипами *NAM-A1*, имели высокое содержание белка в зерне, в то время как между мутантным аллелем и содержанием белка в зерне выявлена отрицательная корреляция, независимо от гаплотипа *NAM-A1* (Alhabbar et al., 2018).

Сочетание генов *NAM-A1/B1* оказало значимое влияние на формирование всех изученных признаков пшеницы, при этом масса зерна с растения статистически не зависима от гаплотипа *NAM-A1*, а длина колоса и масса 1000 зерен – от аллеля гена *NAM-B1*. Необходимо также отметить невысокий совместный вклад этих двух генетических факторов в изменчивость большинства изученных признаков продуктивности (7.59–18.75 %), но при этом преобладание *NAM-A1/B1* в изменчивости содержания белка в зерне (72 %).

Известно, что, кроме генетического контроля, урожай и его компоненты находятся под значительным влиянием факторов внешней среды (Ahmed et al., 2020; Kronenberg et al., 2021). В нашем исследовании показана высокая статистическая значимость вклада погодных условий для изменчивости количественных признаков пшеницы. Особенно значительная роль данного фактора (более 50 %) выявлена для дисперсии признаков с широкой нормой реакции и высоким коэффициентом вариации, сильно зависящих от температуры окружающей среды и количества

осадков, — «высота растения» и «число колосков в колосе». Для остальных изученных признаков доля изменчивости, обусловленная погодными условиями, была существенно ниже и находилась в диапазоне 1.57–18.48 %, а большое значение имело взаимодействие «*NAM-A1/B1* × погодные условия» (> 60 %). Согласно нашим данным, влияние взаимодействия «*NAM-B1* × погодные условия» на признаки продуктивности ниже, чем вклад других факторов, а для признаков «длина колоса», «число зерен с колоса» и «содержание белка в зерне» он статистически незначим (см. Приложение 5).

Следует подчеркнуть высокую долю влияния *NAM-B1* на уровень накопления белка (70 %), что наряду с низким вкладом погодных условий и отсутствием генотип-средового взаимодействия указывает на эффективность интрогрессии функционального аллеля для улучшения качества зерна пшеницы в условиях Беларуси. В ряде работ зарубежных ученых показано значимое влияние взаимодействия «*NAM-B1* × среда» на признаки продуктивности и качества зерна пшеницы. Например, в исследовании (Carter et al., 2012) установлено, что различия условий среды влияют на экспрессию гена *NAM-B1*, что ограничивает использование интрогрессии функционального аллеля для повышения уровня накопления белка в зерне яровой пшеницы в регионах с коротким вегетационным периодом. Однако при изучении эффектов *NAM-B1* на общее содержание белка в зерне и основные компоненты урожайности мягкой пшеницы в Аргентине для большинства изученных признаков (в том числе для массы 1000 зерен и содержания белка) не показано значимого взаимодействия «*NAM-B1* × среда» и «*NAM-B1* × генотип», при этом влияние факторов «генотип» и «среда» было статистически значимо (Tabbitta et al., 2013).

Заключение

Впервые установлены и зарегистрированы в международной молекулярной базе данных GenBank полноразмерные нуклеотидные последовательности гена *NAM-A1* образцов *T. kiharae*, *T. spelta* к-1731, *T. dicoccoides* к-5199, *T. dicoccum* к-45926. Исследованные образцы родственных видов мягкой пшеницы имели гаплотип *NAM-A1a*, за исключением *T. spelta* к-1731 (*NAM-A1c*). Для сортов *T. aestivum* характерны как гаплотип *NAM-A1d*, так и *NAM-A1a*. Среди родительских форм функциональный аллель гена *NAM-B1* обнаружен только у образцов видов-сородичей. Интрогрессивные линии, как правило, наследовали варианты генов *NAM-I* исходного сорта пшеницы. Из 22 интрогрессивных линий гаплотип *NAM-A1* родственного вида выявлен у 6 линий, а функциональный аллель *NAM-B1* — у 5. Линии 13-3 *T. dicoccoides* × Фестивальная (*a/F*) и 7 *T. spelta* к-1731 × Саратовская 29 (*c/F*) имели гаплотип *NAM-A1* и аллель *NAM-B1* от *T. dicoccoides* и *T. spelta* соответственно.

Результаты генотипирования интрогрессивных линий мягкой пшеницы и родительских форм по генам *NAM-A1* и *NAM-B1* сопоставлены с результатами полевых испытаний в условиях Беларуси и данными анализа содержания белка в зерне 2017–2021 гг. Сочетание генов *NAM-A1/B1* оказало значимое влияние на формирование всех изученных признаков пшеницы, при этом масса зерна с рас-

тения статистически независима от гаплотипа *NAM-A1*, а длина колоса и масса 1000 зерен — от аллеля *NAM-B1*. Совместный вклад этих двух генетических факторов в изменчивость хозяйственно важных признаков составляет от 8–10 % (масса зерна с растения и масса 1000 зерен) до 72 % (накопление белка в зерне).

Для большинства изученных признаков доля изменчивости, обусловленная погодными условиями, была невелика (1.57–18.48 %). Самая тесная корреляция установлена между большинством изученных признаков и ГТК в фазу налива зерна. Взаимодействие «*NAM-A1/B1* × погодные условия» определяет 65–71 % изменчивости признаков зерновой продуктивности пшеницы, но при этом не значимо для содержания белка в зерне. Вклад взаимодействия «*NAM-B1* × погодные условия» на количественные признаки ниже, чем вклад других факторов, а для признаков «длина колоса», «число зерен с колоса» и «содержание белка в зерне» он статистически незначим. Выявлено, что наличие функционального аллеля *NAM-B1* обеспечивает высокий уровень накопления белка в зерне независимо от погодных условий и при этом не приводит к существенному снижению массы 1000 зерен.

Оценка эффекта шести комбинаций аллелей *NAM-A1/B1* на уровень проявления ряда хозяйственно полезных признаков пшеницы показала, что высокая продуктивность колоса и растения, но низкий уровень содержания белка в зерне характерны для генотипов *d/NF*, наибольшая концентрация белка и невысокие показатели по основным признакам продуктивности — для *a/F*. Оптимальное сочетание изученных признаков пшеницы выявлено для генотипов *d/F*. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности интрогрессии функционального аллеля *NAM-B1* от видов-сородичей для повышения питательной ценности мягкой пшеницы.

Список литературы / References

- ГОСТ 10846-91. Межгосударственный стандарт. Зерно и продукты его переработки. Метод определения белка. М.: Стандартинформ, 2009.
- [GOST 10846-91. Interstate standard. Grain and products of its processing. Method for determination of protein. Moscow: Standartinform Publ., 2009. (in Russian)]
- Мамонтова Л.И., Хромов С.П. Метеорологический словарь. Л.: Гидрометеиздат, 1974.
- [Mamontova L.I., Khromov S.P. Meteorological Dictionary. Leningrad: Gidrometeizdat Publ., 1974. (in Russian)]
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. М.: Высш. шк., 1973; 225-226.
- [Rokitsky P.F. Biological Statistics. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1973. (in Russian)]
- Ahmed H.G.M., Sajjad M., Zeng Y., Iqbal M., Khan S.H., Ullah A., Akhtar M.N. Genome-wide association mapping through 90K SNP array for quality and yield attributes in bread wheat against water-deficit conditions. *Agriculture*. 2020;10(9):392. DOI 10.3390/agriculture10090392.
- Alhabbar Z., Yang R., Juhasz A., She M., Anwar M., Sultana N., Diepeveen D., Ma W., Islam S. *NAM* gene allelic composition and its relation to grain-filling duration and nitrogen utilization efficiency of Australian wheat. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205448. DOI 10.1371/journal.pone.0205448.
- Avni R., Zhao R., Pearce S., Jun Y., Uauy C., Tabbitta F., Fahima T., Slade A., Dubcovsky J., Distelfeld A. Functional characterization of *GPC-1* genes in hexaploid wheat. *Planta*. 2014;239(2):313-324. DOI 10.1007/s00425-013-1977-y.

- Brevis J.C., Morris C.F., Manthey F., Dubcovsky J. Effect of the grain protein content locus *Gpc-B1* on bread and pasta quality. *J. Cereal Sci.* 2010;51:357-365. DOI 10.1016/j.jcs.2010.02.004.
- Carter A.H., Santra D.K., Kidwell K.K. Assessment of the effects of the *Gpc-B1* allele on senescence rate, grain protein concentration and mineral content in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from the Pacific Northwest Region of the USA. *Plant Breed.* 2012; 131(1):62-68. DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01900.x.
- Chen X., Song G., Zhang S., Li Yu., Gao J., Islam S., Ma W., Li G., Ji W. The allelic distribution and variation analysis of the *NAM-B1* gene in Chinese wheat cultivars. *J. Integr. Agric.* 2017;16(6):1294-1303. DOI 10.1016/S2095-3119(16)61459-4.
- Cormier F., Throude M., Ravel C., Le Gouis J., Leveugle M., Lafarge S., Exbrayat F., Duranton N., Prud S. Detection of *NAM-A1* natural variants in bread wheat reveals differences in haplotype distribution between a worldwide core collection and European elite germplasm. *Agronomy.* 2015;5(2):143-151. DOI 10.3390/agronomy 5020143.
- Hagenblad J., Aspland L., Balfourier F., Ravel C., Leino M.W. Strong presence of the high grain protein content allele *NAM-B1* in Fenoscandian wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(8):1677-1686. DOI 10.1007/s00122-012-1943-2.
- Iqbal M., Moakhar N.P., Strenzke K., Haile T., Pozniak C., Hucl P., Spaner D. Genetic improvement in grain yield and other traits of wheat grown in Western Canada. *Crop Sci.* 2016;56(2):613-624. DOI 10.2135/cropsci2015.06.0348.
- Kronenberg L., Yates S., Boer M.P., Kirchgessner N., Walter A., Hund A. Temperature response of wheat affects final height and the timing of stem elongation under field conditions. *J. Exp. Bot.* 2021; 72(2):700-717. DOI 10.1093/jxb/eraa471.
- Kuhn J.C., Stubbs T.L., Carter A.H. Effect of the *Gpc-B1* allele in hard red winter wheat in the US Pacific Northwest. *Crop Sci.* 2016;56(3): 1009-1017. DOI 10.2135/cropsci2015.08.0470.
- Kumar A., Kapoor P., Chunduri V., Sharma S., Garg M. Potential of *Aegilops* sp. for improvement of grain processing and nutritional quality in wheat (*Triticum aestivum*). *Front. Plant Sci.* 2019;10:308. DOI 10.3389/fpls.2019.00308.
- Lawlor D.W., Kontturi M., Young A.T. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *J. Exp. Bot.* 1989;40(1):43-52. DOI 10.1093/jxb/40.1.43.
- Maphosa L., Collins N.C., Taylor J., Mather D.E. Post-anthesis heat and a *Gpc-B1* introgression have similar but non-additive effects in bread wheat. *Funct. Plant Biol.* 2014;41(9):1002-1008. DOI 10.1071/FP14060.
- Mishra V.K., Pushendra K.G., Balasubramaniam A., Ramesh C., Neeraj K.V., Manish K.V., Punam S., Arun K.J. Introgression of a gene for high grain protein content (*Gpc-B1*) into two leading cultivars of wheat in Eastern Gangetic Plains of India through marker assisted backcross breeding. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 2015;7(8): 292-300. DOI 10.5897/JPCS2015.0514.
- Orlovskaya O., Dubovets N., Solovey L., Leonova I. Molecular cytological analysis of alien introgressions in common wheat lines derived from the cross of *Triticum aestivum* with *T. kiharae*. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1):201. DOI 10.1186/s12870-020-02407-2.
- Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A., Khotyleva L.V., Shumny V.K. Molecular cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the genetic material of *Triticaceae* tribe species. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(5):527-536. DOI 10.1134/S2079059716050087.
- Peleg Z., Saranga Y., Yazici A., Fahima T., Ozturk L., Cakmak I. Grain zinc, iron and protein concentrations and zinc-efficiency in wild emmer wheat under contrasting irrigation regimes. *Plant Soil.* 2008; 306:57-67. DOI 10.1007/s11104-007-9417-z.
- Puranik S., Sahu P.P., Srivastava P.S., Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2012;17(6):369-381. DOI 10.1016/j.tplants.2012.02.004.
- Tabbitta F., Lewis S., Vouilloz J.P., Ortega M.A., Kade M., Abbate P.E., Barneix A.J. Effects of the *Gpc-B1* locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breed.* 2013;132(1):48-52. DOI 10.1111/pbr.12011.
- Tabbitta F., Pearce S., Barneix A.J. Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: ten years of the *GPC-B1* gene. *J. Cereal Sci.* 2017;73:183-191. DOI 10.1016/j.jcs.2017.01.003.
- Uauy C., Brevis J.C., Dubcovsky J. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *J. Exp. Bot.* 2006a;57(11):2785-2794. DOI 10.1093/jxb/erl047.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubkovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science.* 2006b;314(5803):1298-1301. DOI 10.1126/science.1133649.
- Vishwakarma M.K., Arun B., Mishra V.K., Yadav P.S., Kumar H., Joshi A.K. Marker-assisted improvement of grain protein content and grain weight in Indian bread wheat. *Euphytica.* 2016;208(2): 313-321. DOI 10.1007/s10681-015-1598-6.
- Wang X., Below F.E. Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. *Crop Sci.* 1996;36(1): 121-126. DOI 10.2135/CROPSCI1996.0011183X003600010022x.
- Waters B.M., Uauy C., Dubcovsky J., Grusak M.A. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Exp. Bot.* 2009;60(15):4263-4274. DOI 10.1093/jxb/erp257.
- Yang R., Juhasz A., Zhang Y., Chen X., Zhang Y., She M., Zhang J., Maddern R., Edwards I., Diepeveen D., Islam S., Ma W. Molecular characterisation of the *NAM-1* genes in bread wheat in Australia. *Crop Pasture Sci.* 2018;69(12):1173-1181. DOI 10.1071/CP18273.
- Zhao D., Derks A.P., Liu D.C., Buchner P., Hawkesford M.J. Overexpression of a NAC transcription factor delays leaf senescence and increases grain nitrogen concentration in wheat. *Plant Biol.* 2015; 17(4):904-913. DOI 10.1111/plb.12296.

ORCID ID

O.A. Orlovskaya orcid.org/0000-0002-1187-1317
S.I. Vakula orcid.org/0000-0002-2242-7107
L.V. Khotyleva orcid.org/0000-0003-0295-5022
A.V. Kilchevsky orcid.org/0000-0002-0175-9786

Благодарности. Работа выполнена при поддержке проекта 2.1.2. ГПНИ «Биотехнологии-2».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.03.2022. После доработки 26.01.2023. Принята к публикации 30.01.2023.

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

Морфогенетические особенности репродуктивной биологии в селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)

Т.П. Жужжалова , А.А. Налбандян, Е.Н. Васильченко , Н.Н. Черкасова

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия

 biotechnologiya@mail.ru; vasilchenko@inbox.ru

Аннотация. В обзоре рассмотрены процессы морфогенеза, задействованные при разработке методов размножения и создания нового исходного материала сахарной свеклы. Показано, что методы партикуляции, микроклонирования *in vitro* и клеточной селекции, отражая неполовые формы репродукции растений, повышают результативность селекционных экспериментов. Приведены данные применения методов культуры *in vitro*, сохраняющих склонность растений к вегетативному размножению и стимулирующих повышение генетической изменчивости при использовании мутагенов этилметансульфоната, методов генетической трансформации (бактериальные гены *mf2* и *mf3*) и селективных агентов (ионы Cd^{++} и абсцизовая кислота). Отражены результаты применения методов оценки степени самонесовместимости растений: флуоресцентной микроскопии, цитофотометрии, и определения уровня фитогормонов и содержания нуклеиновых кислот в ядрах клеток для прогнозирования завязываемости семян. Выявлено, что длительное самоопыление растений вызывает снижение фертильности пыльцевых зерен, стерилизацию мужских гамет и образование пистиллодийных цветков. Самофертильные растения, выделенные из этих линий, служат закрепителями стерильности. В обзоре продемонстрирована роль апомиксиса в реализации изменчивости при онто- и филогенетическом развитии растений. Отражены морфологические особенности развития половых и соматических клеток зародышей *in vitro* при формировании проростков на основе флоральной и вегетативной эмбриогении. Применение молекулярно-генетических маркеров SNP и SSR, обладающих высоким уровнем полиморфизма, оказалось эффективным для характеристики создаваемого селекционного материала гибридов при проведении скрещиваний. Интерес для селекции представляют исследования исходных материалов сахарной свеклы на наличие минисателлитных локусов TRs, позволившие выявлять растения-опылители О-типа (закрепитель стерильности) и растения МС (мужскостерильные) формы. Созданный материал может найти широкое использование в селекционной работе при создании гибридных форм, сокращая сроки селекции в 2–3 раза. Обсуждаются перспективы разработки и возможности применения новых методов и оригинальных схем в генетике, биотехнологии и селекции сахарной свеклы.

Ключевые слова: сахарная свекла; репродукция; морфогенез; эмбриогения; молекулярные маркеры; самонесовместимость; цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС); апомиксис.

Для цитирования: Жужжалова Т.П., Налбандян А.А., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Морфогенетические особенности репродуктивной биологии в селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(3):207-217. DOI 10.18699/VJGB-23-27

Morphogenetic peculiarities of reproductive biology in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding

T.P. Zhuzhzhlova , A.A. Nalbandyan, E.N. Vasilchenko , N.N. Cherkasova

The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, vil. VNISS, Ramonsky district, Voronezh region, Russia

 biotechnologiya@mail.ru; vasilchenko@inbox.ru

Abstract. This review considers the processes of morphogenesis used in the development of propagation methods and the creation of a new starting material for sugar beet. It has been demonstrated that methods of particulation, *in vitro* microcloning and cell breeding that reflect non-sexual forms of plant reproduction increase the effectiveness of breeding experiments. The review describes the *in vitro* culture methods maintaining a tendency in plants for vegetative propagation and stimulating increase in genetic variability of properties when mutagens such as ethyl methanesulfonate, alien genetic structures with *mf2* and *mf3* bacterial genes in *Agrobacterium tumefaciens* strains, and selective agents (Cd^{++} ions and abscisic acid) are incorporated into plant cells. It presents the results of using fluorescent microscopy, cytophotometry, biochemical analysis and determining the level of phytohormones and content of nucleic acids in nuclei for forecasting the seed setting ability. It has demonstrated that long self-pollination of plants causes decrease in fertility of pollen grains, resulting in the sterilization of male gametes and the appearance of pistillody flowers. Self-fertile plants isolated from these lines serve as sterility fixers, while the apomixis elements increased the ovule number, additional embryo sacs and embryos. A role of apomixis in contributing to variability in

the onto- and phylogenetic development of plants have been substantiated. The review reflects the morphological features of the *in vitro* development of sexual and somatic cells in embryos during the formation of seedlings based on floral and vegetative embryoidogeny. Use of the SNP and SSR (Unigenes) molecular-genetic markers having a high polymorphism level has appeared effective to characterize the developed breeding material and hybrid components when carrying out crossings. The study of sugar beet starting materials for the presence of TRs mini-satellite loci making it possible to reveal O-type plants-pollinators (sterility fixing agent) and MS-form plants are of interest for breeding as well. The selected material can be widely used in breeding to produce hybrids, allowing for a 2–3-fold reduction of the development period. The review also discusses the prospects for the development and implementation of new methods and original schemes in sugar beet genetics, biotechnology and breeding.

Key words: sugar beet; reproduction; morphogenesis; embryoidogeny; molecular markers; self-incompatibility; cytoplasmic male sterility (CMS); apomixis.

For citation: Zhuzhzhhalova T.P., Nalbandyan A.A., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Morphogenetic peculiarities of reproductive biology in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):207–217. DOI 10.18699/VJGB-23-27

Введение

Первые исследования репродуктивных свойств сахарной свеклы относятся к началу XX в. В этот период были определены систематическое положение и пути эволюции данного вида, проведено изучение эмбриологических закономерностей и морфологических свойств органов, тканей и клеток растений. Находят отражение исследования особенностей развития цветка сахарной свеклы, формирования пыльников, пыльцевых зерен. Установлены анатомические и эмбриологические закономерности развития семязачатка, зародыша и семени, подготавливается атлас рисунков по анатомии *Beta vulgaris*, где представлены основные морфологические признаки этого вида. В дальнейшем более глубокие исследования включали процессы формирования цветка и его элементов, стадии редукционного деления, этапы образования пыльцы, зародышевого мешка, формирования зародыша и семени. Это стало стартом широкого развертывания работ по генетике и селекции данной культуры и послужило базой для постановки селекционно-генетических программ, стимулируя создание первых многосемянных сортов-популяций сахарной свеклы (Мазлумов, 1970).

Вторая половина XX в. стала переходным периодом от популяционной селекции к созданию гибридов растений свеклы с признаками цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), раздельноплодности и повышенного уровня плоидности. Этому содействовали результаты изучения структуры кариотипа видов рода *Beta*, особенностей митоза, развития генеративных органов, оплодотворения и эмбриогенеза при создании полиплоидов и самоопыленных линий. Результаты позволили обосновать новое направление в селекционной работе по получению гетерозисных гибридов, обладающих высокой урожайностью и сахаристостью (Балков и др., 2017). Получению высокопродуктивных генотипов с ценными признаками способствовало изучение репродуктивных процессов, обеспечивающих генетическую изменчивость по морфологическим, цитологическим и биохимическим признакам (Simko et al., 2012; Stevanato et al., 2015).

Репродуктивная биология растительных организмов включает четыре главных уровня развития: молекулярный и субклеточный, клеточный, организменный и популяционный, отражающих свойства растений при воспроизведении потомства (Малецкий, 2005). Поэтому при изучении селекционного материала сахарной свеклы при-

меняют широкий круг методов, касающихся различных типов репродукции растений, с использованием генетического маркирования (Banzal et al., 2014), цитологии, эмбриологии, физиологии, морфологии (Paesold et al., 2012; Tomaszevska-Sowa et al., 2017). В процессе исследований учитывается специфика репродукции растений в отношении многовариантности способов образования индивидуумов (половой, бесполой, апомиксис), различных путей морфогенеза (эмбриогенез, эмбриоидогенез и геммориогенез) и типов размножения (семенное, вегетативное) (Батыгина, Виноградова, 2007). Такой подход позволяет прогнозировать генотип потомства и открывает новые перспективы в управлении отдельными этапами онтогенеза и при разработке оригинальных селекционных программ (Малецкая, Малецкий, 2010; Бартенев и др., 2018).

В настоящее время в селекции растений наиболее активно применяются методы молекулярного маркирования. Высокая частота встречаемости молекулярных маркеров в геноме, обнаруживаемая с помощью универсальных и постоянно развивающихся методов анализа, позволяет использовать ДНК-маркеры в селекции (Хлесткина, 2013). Это дает возможность не только точно и быстро выявлять генетическое разнообразие популяций, линий и гибридов сахарной свеклы, но и определять селекционную ценность растительного материала, создаваемого опытным путем (Налбандян и др., 2020). Наиболее эффективным считается использование молекулярных маркеров ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), SSR (Simple Sequence Repeats), SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Цель настоящей работы – обобщение литературных и собственных данных и методов, применяемых для характеристики морфогенетического потенциала сахарной свеклы на разных этапах ее развития.

Репродукция вегетативных тканей растений

Партикуляция. Для стабилизации наиболее ценных признаков и свойств селекционного материала сахарной свеклы часто используют способность растений к размножению вегетативным путем, что обусловлено особенностями морфолого-анатомического строения корня, стебля, ростовых почек и их преобразованием в онтогенезе.

Процессы роста и развития растений после прорастания семян включают формирование листового аппарата и

корнеплодов. Обычно в этот период верхняя часть корнеплода – «головка» – представляет собой куполообразный укороченный стебель, где листья располагаются по типу розетки. В центре розетки имеется верхушечная почка, у основания листьев – пазушные почки, формирующиеся путем органогенеза.

Успех вегетативного размножения в зимний период надежно определяется предварительным использованием процесса яровизации, обеспечивающего эпигенетические изменения экспрессии генов, вызывающих развитие растений после яровизации (Шевелуха, 1992; Лутова и др., 2010). Наблюдаемая активизация меристематических тканей (феллоген, камбий), стимулирующая на корнеплодах развитие верхушечной и пазушной почек, а затем центрального и боковых побегов, обеспечивала быстрое размножение селекционного материала путем травматической партикуляции (Барыкина и др., 2004). Для этого отобранные из суперэлиты корнеплоды (педигри) разделяли на 4–8 частей, где одну часть клонировали, а при выращивании остальных получали семена.

Недостатками этого метода были значительная длительность (до 5 лет) создания выровненного материала, ограниченное количество размноженных клонов и большая трудоемкость процесса. Вместе с тем данный прием давал возможность в течение нескольких поколений сохранять в относительной чистоте генотипы с высокой урожайностью и сахаристостью. Настоящий метод нашел широкое распространение и применение в селекционных схемах на основе индивидуального отбора в сочетании с клонированием и гибридизацией (Балков и др., 2017).

Для ускорения размножения позднее был использован способ клонирования свеклы на базе развития боковых побегов (с 3–8 листьями) из пазушных почек корнеплода, а затем их укоренения. Метод давал возможность значительно увеличить количество укорененных побегов и выращенных растений. Однако этот способ не получил широкого распространения в селекции сахарной свеклы.

Способность растений сахарной свеклы к партикуляции является одним из резервов системы репродукции и в сочетании с семенным размножением позволяет обеспечивать пластичность организма, выживание и сохранение *B. vulgaris* как вида.

Микроклонирование. Наиболее перспективными для использования в селекции оказались биотехнологические методы массового вегетативного размножения растений в условиях *in vitro* (Murashige, 1974). Принципиальная основа данных методов заключается в способности соматических клеток при культивировании восстанавливать целостность организма со всеми его признаками (Атанасов, 1993).

Установлено, что вегетативные клетки формируют растение двумя путями: из каллусной ткани через регенерацию почек и эмбрионидов или в результате активации развития непосредственно из меристем апекса стебля, пазушных и спящих почек (Катаева, Бутенко, 1983; Rusea et al., 2020). Однако длительное пассивирование каллуса приводило к изменению плоидности, накоплению генных мутаций, потере морфологического потенциала. Наиболее широкое распространение получило применение в качестве эксплантов меристемы побегов, а также листо-

вых пластинок, черешков, пыльников, семязачатков, зародышей и семян (Лейке и др., 1980). При использовании гормональной активизации этого материала наблюдалось развитие ростовых почек и проростков (Ильенко, 1983; Seman, Farago, 1988).

Наиболее подходящим методом для разработки микроклонирования сахарной свеклы оказалось использование апикальной меристемы, обладающей высокой генетической стабильностью клеток и их повышенной способностью к морфогенезу (Знаменская, 2010). Апикальная меристема может давать начало наземным органам растений, которые формируются по модульному типу (элемент побега включает: лист, междоузлие, пазушную почку), а стволовые клетки меристемы способны дифференцироваться и стимулировать развитие новых органов (Лутова и др., 2010). Существенной основой метода стало также уникальное свойство тотипотентности растительных клеток, способных при отделении от маточных растений и под воздействием экзогенных факторов культуральной среды восстанавливать растительный организм со всеми его свойствами (Шевелуха, 1992).

При разработке метода микроклонирования обязательным приемом было выращивание исходного материала для эксплантации в условиях закрытого грунта, что позволило снять инфицированность эксплантов в 1.5 раза (Знаменская, Жужжалова, 1989). Дальнейшее культивирование материала обязательно включало оптимизацию режима стерилизации верхушечной меристемы эксплантов при использовании 0.05 % раствора сулемы в течение 1–3 часов.

Соблюдение оптимального гормонального баланса основных веществ: гиббереллина, 6-бензиламинопурина и кинетина в концентрации 0.2–0.3 мг/л, при соотношении этих компонентов в питательной среде 1:1:1, стимулировало морфогенез. При корнеобразовании эту роль выполняли индолилмасляная или индолилуксусная кислота в количестве 1 мг/л. При данных концентрациях число боковых побегов на один эксплант повысилось до 9–10 шт., прирост микроклонов – до 73.4 мм, а корнеобразование – до 74.3 %. Разработанный метод дал возможность получать неограниченное количество клонов от одного донора, сократив продолжительность селекционного периода вдвое, минуя двухлетний цикл развития сахарной свеклы (Знаменская, Жужжалова, 1989). Потомство созданных линий, благодаря тотипотентности, сохраняло в полевых условиях генотип, фенотип, плоидность, раздельноцветковость и способность закреплять признак ЦМС.

Для длительного использования созданного линейного материала в селекционной практике в настоящее время применяют трехлетний цикл селекционных, биотехнологических и агротехнических приемов (Колесникова, Жужжалова, 2018). На первом этапе отобранные гибридные генотипы вводят в культуру *in vitro* и затем переводят в генетический банк элитных клонов, обеспечивая длительность хранения ценных свойств материала. Второй этап включает микроразмножение элитных регенерантов, укоренение и перевод в почвенный субстрат теплиц для формирования штеклингов (небольших корнеплодов) массой около 100 г. На третьем этапе выращивают растения для получения семян элиты. Уборку семян осуществляют

раздельно. Растения МС-формы и гетерозисного опылителя срезают и обмолачивают индивидуально. Этот прием внес существенный вклад в селекционно-семеноводческий процесс при создании высокопродуктивных гибридов нового поколения во ВНИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова (г. Рамонь, Воронежская область) и применяется в коммерческих целях.

Клеточная селекция. Селекция на клеточном уровне включает разработку методов культивирования изолированных клеток, органов и тканей растений, что позволяет расширить спектр наследственной изменчивости. Поэтому методы с добавлением в питательные среды различных химических и физических факторов, таких как: мутагенные вещества, генетические конструкции с чужеродными генами, селективные агенты и т. д., стимулируют изменчивость растительных организмов и повышают устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды (Дубровная, 2017; Kourelis, van der Hoorn, 2018).

Проведенные эксперименты показали, что мутаген этилметансульфонат оказывает стимулирующее воздействие на клетки черешков листьев сахарной свеклы в концентрации от 2 до 6 мМ в течение 30 мин (Hohmann et al., 2005; Васильченко и др., 2020б). Высокая способность к регенерации диплоидного растительного материала составляла 38.1–53.1 %, у гаплоидов достигала 71.3–87.5 %. Применение данного метода также обеспечивало генетическую изменчивость регенерантов путем повышения плоидности гаплоидов до диплоидного и полиплоидного уровня. Молекулярно-генетический анализ с использованием специфического SSR-маркера mSSCIR 47 позволил отобрать 9 линий, в генотипах которых под воздействием мутагена произошли изменения. Выраживание выделенных линий в условиях закрытого грунта дало возможность сохранить до 92 % микроклонов и получить небольшие корнеплоды массой от 30 до 89 г (Васильченко и др., 2020а). Исследования будут продолжены во ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова. Для дальнейшего изучения материала будет применен метод TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), разработанный С.М. Mc Callum с коллегами (2000).

Эффективным оказалось использование генетических конструкций *Agrobacterium tumefaciens* с бактериальными генами *mf2* (*Bacillus thuringiensis*) и *mf3* (*Pseudomonas fluorescens*), индуцирующих неспецифическую устойчивость к грибным и вирусным патогенам (Dzhavakhia et al., 2005; Васильченко и др., 2009). Кокультивирование растительных тканей сахарной свеклы и *A. tumefaciens* с чужеродными генами *mf2* и *mf3* позволило создать генно-модифицированные растения сахарной свеклы, устойчивые к фузариозным гнилям, трансгенная природа которых была подтверждена молекулярным и биохимическим анализами, а также фитопатологической оценкой в закрытом грунте (Хуссейн и др., 2013; Васильченко и др., 2014). Всего было создано семь новых линий сахарной свеклы с геном *mf2* и восемь линий с геном *mf3*.

Интересным было воздействие ионов тяжелых металлов, в частности Cd^{2+} , на культивируемые проростки семян (Черкасова и др., 2020). Проведение нескольких отборов при концентрации 4 мМ ацетата кадмия ($Cd(CH_3CO_2)_2$) показало высокую адаптивную способность

и выживаемость регенерантов, достигающую 74.8 %, что свидетельствовало о повышенном уровне их устойчивости. Молекулярно-генетический анализ данных микроклонов выявил наличие определенных значимых SNP в гене *МТР4*, предположительно, играющих ключевую роль в формировании устойчивости к данному абиотическому фактору, что перспективно для современной селекции (Налбандян и др., 2019; Хуссейн и др., 2021).

Известно, что абсцизовая кислота (АБК) является стрессовым гормоном растений, играющим роль в механизмах повышения устойчивости организмов к засухе благодаря снижению устьичной проводимости и транспирации (Лутова и др., 2010). Абсцизовая кислота отслеживает в растениях абиотический стресс (засоление, засуха, температура), вызывая покой тканей растений (клетки, почки, листья) путем закрывания устьиц. Возможно также, что данный гормон выполняет важную роль в качестве стимулятора, запускающего процесс повышения устойчивости, который в дальнейшем развивается уже независимо от содержания этого вещества (Титов и др., 2007). Поэтому изучение свойств АБК при использовании в культуре *in vitro* может надежно способствовать созданию селекционного материала, устойчивого к засухе. В результате проведенных нами исследований выявлена оптимальная концентрация с (2.0–3.0 мг/л), обеспечивающая отбор устойчивых к засухе регенерантов сахарной свеклы в количестве 70.0–87.5 % (Черкасова и др., 2018, 2021). Это дает возможность использовать АБК для моделирования засухи при создании форм сахарной свеклы, толерантных к осмотическому стрессу.

Повышение адаптивных свойств регенерантов в репродуктивном цикле развития позволяет увеличивать спектр генетической изменчивости, создавать новый исходный материал и быстро его размножать.

Репродуктивная способность генеративных органов

Само- и перекрестная несовместимость

Сахарная свекла – однодомный гермафродитный вид, растениям которого свойственны перекрестное опыление и состояние самонесовместимости, препятствующее самооплодотворению. В популяциях сахарной свеклы различного происхождения наибольшую группу (65.3–78.1 %) составляют самонесовместимые растения. Эти растения при изоляции, после 1–2-кратного инцухта, не завязывают семена. Частота встречаемости самосовместимых (самофертильных) форм в сортовых популяциях очень незначительна и варьирует в пределах 4.3–12.9 % при фертильности пыльцевых зерен, достигающей 83.6–98.2 %. Самофертильные линии, как правило, характеризуются более высокими уровнем урожайности корнеплодов и сахаристостью, хотя инбредную депрессию у них по некоторым признакам полностью снять не удавалось.

Эксперименты показали, что у ряда форм самонесовместимость индивидуальных растений практически не меняется при изменении экологических условий их возделывания (Корниенко, Знаменская, 2001). Так, выращивание растений сахарной свеклы в различных экологических зонах почти не влияло на завязываемость семян, которая

была в среднем 7.4 % в Рамони (Воронежская область) и 6.3 % в Пржевальске (Киргизия). В то же время в работах ряда исследователей показано, что завязываемость семян при самоопылении растений в условиях пониженных температур значительно выше, чем при более высоких. Это открытие легло в основу метода репродукции семян при низких температурах, с помощью которого была создана обширная коллекция инбредных линий сахарной свеклы (Малецкий, Малецкая, 1996). Расхождения в результатах разных исследователей указывают на сложность процессов семенной репродукции у сахарной свеклы. Генетические и физиологические механизмы этих процессов требуют дальнейшего изучения и остаются важными вопросами в решении проблемы полового воспроизведения.

Согласно современным генетическим данным, система несовместимости у сахарной свеклы довольно сложная, гаметофитного типа и основана на комплементарном взаимодействии аллелей 2–4 S-локусов (Larsen, 1977). Эти данные также учитывались при создании линейного материала путем самоопыления и преодоления физиологического барьера само- и перекрестной несовместимости для успешного перехода от популяционной селекции к получению межлинейных гетерозисных гибридов.

Среди внутренних факторов, определяющих формирование семян при инкутировании, основное место занимает генетическая и гормональная регуляция процесса оплодотворения. Завязываемость семян у самосовместимых линий оставалась на уровне самоопыления или несколько снижалась. Внутрелинейные скрещивания частично совместимых линий повышали завязываемость семян в 1.5–13 раз. Перспективным приемом оказалось также проведение отбора отдельных растений внутри изучаемых линий, отличающихся по восприимчивости рыльца к пыльце и способности производить опыление. Такой отбор позволил создавать линейный материал с преимущественными признаками материнской или отцовской формы, что повышало эффективность близкородственных (внутрилинейных) скрещиваний (Корниенко и др., 2014).

Для определения степени несовместимости и изучения роста пыльцевых трубок использовали флуоресцентную микроскопию с модификацией метода для сахарной свеклы (Зайковская, Жужжалова, 1976; Вайсман и др., 1984). Метод стал основой для установления потенциальной семенной продуктивности растений уже в фазу цветения, что позволило выявлять завязываемость семян и осуществлять подбор пар непосредственно при гибридизации селекционного материала по активности роста пыльцевых трубок. Локализация реакции несовместимости четко выражалась в морфологическом изменении пыльцевых трубок, утолщениях, вздутиях, подавлении активности роста на рыльце пестика или в завязи, в зоне отложения оксалата кальция. Считается, что важную роль в росте пыльцевых трубок играют ионы Ca^{++} , являющегося одним из первых регуляторов прорастания пыльцы (Bednarska, 1989). Никакое иное вещество не способствует прорастанию, если нет ионов Ca^{++} .

По времени действия генов самонесовместимости и месту локализации их продуктов различают спорофитную и гаметофитную несовместимость. Морфологически это проявляется при спорофитном типе реакции – на рыльце

пестика, а при гаметофитной системе – в столбике. У сахарной свеклы, согласно современным представлениям, локализация реакции самонесовместимости соответствует типу, характерному для видов с гаметофитным контролем несовместимости (Вишнякова, 1998).

Показателем проявления генов несовместимости стало также содержание нуклеиновых кислот в ядрах клеток завязи и семязачатка сахарной свеклы, установленное методом цитофотометрии (Жужжалова и др., 2007). В случае совместимого опыления обычно в этих клетках наблюдалось увеличение количества РНК и суммы нуклеиновых кислот на ядро. Соотношение РНК/ДНК при несовместимом опылении оставалось неизменным, как и в неопыленных пестиках. Значительное увеличение количества РНК до 36 % отмечено после третьего дня задержки опыления. Возможно, что генетически детерминированный механизм несовместимости на данной стадии в молекулах ДНК, как и у других растений, служит показателем функциональных изменений в ядрах семязачатков, связанных с процессом оплодотворения (Ковалева, 1991). Это дает возможность предположить, что оплодотворение стимулирует процессы транскрипции и редупликации, которые способствуют увеличению содержания РНК и суммы нуклеиновых кислот на ядро. Ослабление барьера несовместимости коррелирует с накоплением РНК в клеточных ядрах. Полученные данные также свидетельствуют, что генетические и физиологические свойства несовместимости не выяснены и остаются важными вопросами при изучении этой проблемы.

Дальнейшие исследования показали, что процессы роста пыльцевых трубок сопровождаются также сложными перестройками в гормональной системе рыльца и столбика растений. Это подтверждается экспериментами по определению уровня эндогенных фитогормонов: этилена, ИУК, АБК, гиббереллинов, цитокининов, в спорофитных тканях пестика (Ковалева и др., 2016). Поэтому вопросы функционирования системы репродукции растений с выделением особой роли само- и перекрестной несовместимости остаются перспективными для изучения в будущем.

Использование данного признака является целесообразным приемом для преодоления барьера несовместимости в плане развития работ по гетерозисной селекции, включающем контролируемые скрещивания и получение межлинейных гибридов на фертильной основе.

Цитоплазматическая мужская стерильность

Известно, что у свеклы существует два типа цитоплазмы – нормальная (N) и стерильная (S), влияние которых регулируется двумя рецессивными генами, x и z (Owen, 1952). Полная мужская стерильность определяется как $Sxxzz$. Присутствие доминантных генов в гетерозиготном состоянии дает полустерильные формы $SXxz$ и $SXzZ$. Однако многие причины возникновения и формирования ЦМС у свеклы до настоящего времени полностью не установлены и находятся на стадии дальнейшего более глубокого генетического изучения (Дымшиц и др., 2010).

В селекционном процессе поддержание и стабилизацию признака ЦМС у отобранных форм сахарной свеклы осуществляют путем близкородственного размножения с закрепителем ЦМС, обладающим высокой фертиль-

ностью пыльцы и завязываемостью семян (Балков и др., 2017). Выявлению особенностей генетического разнообразия селекционного материала способствует использование ДНК-маркеров. Проведение микросателлитного (SSR) анализа дало возможность установить полиморфизм MC-форм, сростноплодных опылителей (ОП) сахарной свеклы и их гибридов путем определения величины уровня полиморфизма (PIC), установленного для каждого локуса (Налбандян и др., 2021). Применение SSR-маркеров Unigenes (9 пар праймеров) позволило четко дифференцировать материал на основе расчета генетических дистанций и выделить родительские компоненты, наиболее подходящие для проведения скрещиваний. Праймеры, характеризующиеся высоким полиморфизмом к SSR-локусам: Unigene 22373, Unigene 27833, Unigene 16898, Unigene 7492, Unigene 24552, рекомендованы для идентификации селекционных материалов сахарной свеклы (Налбандян и др., 2021).

Интерес для селекции представили также исследования исходных материалов сахарной свеклы на наличие минисателлитных локусов TRs, связанных с цитоплазматической мужской стерильностью (Nishizawa et al., 2000; Брагин и др., 2011). В результате экспериментального скрининга селекционного материала сахарной свеклы на основе минисателлитных локусов TR1 и TR3 выявлено присутствие митохондриальных геномов N- и S-типов (Федулова и др., 2022). Растения MC-форм содержали ампликоны размером 400 п. н. Растения-опылители О-типа (закрепитель стерильности) характеризовались наличием ДНК-ампликонов длиной 700 п. н. для праймера TR1 и 500 п. н. – для праймера TR3. Отобранный материал может найти широкое применение в селекционной работе при создании гибридов, сокращая сроки селекции в 2–3 раза (Каракотов и др., 2021).

В процессе селекционных исследований замечено, что многократное инцухтирование самофертильных линий характеризуется появлением мужской стерильности в виде формирования пистиллодийных цветков (Ошевнев и др., 1986а, б). Вместо тычинок и пыльников в цветке на завязи формировались пистиллодийные структуры – рыльца или семязачатки, но без зародышевых мешков. Фенотипическое расщепление потомств линейного материала в процессе селекции показало, что признак пистиллодийности контролируется моногенно (Ошевнев, Грибанова, 2010). Формы растений со стерильными пыльниками были использованы в качестве материнского компонента межлинейных гибридов сахарной свеклы. Выделенные из этого материала фертильные растения с высокой степенью самосовместимости (самофертильности) стали служить закрепителями стерильных по пыльце форм при создании гибридов. Разработанная схема создания линий О-типа на основе признака пистиллодийности стала завершающим этапом надежного перехода к селекции на гетерозис (Ошевнев, Грибанова, 2010).

Полученные результаты свидетельствуют, что стерилизация мужского гаметофита происходит разными путями, но в итоге приводит к гинодизии, т.е. к появлению в популяциях растений с обоеполюми и женскими цветками. Дальнейшее изучение этого вопроса имеет важное значение для генетических исследований.

Апомиксис (агамоспермия)

Одно из центральных направлений в селекции растений – использование явления апомиксиса (агамоспермии). Данная своеобразная форма размножения, происходящая без слияния гамет, способна обеспечивать в ряде случаев материнскую наследственность, однородность потомства и высокую продуктивность в неограниченном ряду поколений. В связи с этим анализ морфогенетических процессов и изучение эмбриологических особенностей развития агамоспермных форм сахарной свеклы позволяют находить возможные пути практического применения апомиктического размножения в селекционном процессе.

Генетический полиморфизм способов размножения растений, происходящих без слияния гамет, обычно представлен двумя основными типами апомиксиса: **гаметофитным** и **спорофитным**, а также **эмбриондогенной** – образованием соматических зародышей в семязачатке и вегетативных органах.

Гаметофитный апомиксис. Цитологические исследования показали, что растения сахарной свеклы склонны формировать зародыши с гаплоидным набором хромосом путем апогаметии из ядер зародышевого мешка – синергид или антипод. Однако гаметофитный апомиксис у сахарной свеклы выражался в виде диплоспории (Фоменко и др., 2003). Возможно, это было обусловлено использованием селекционного материала, полученного на основе принудительных опылений растений пыльцой, облученной высокими дозами гамма-радиации в пределах 1500–3000 Гр (Агафонов и др., 1992). Цитологическое изучение растений данного материала показало, что процесс мейоза при мегаспорогенезе сопровождается отсутствием образования тетрад мегаспор. В результате клетки зародышевого мешка формировались непосредственно из мегаспороцита и имели нередуцированное число хромосом. Это обычно вызывает нестабильные генетические изменения. Вместе с тем метод позволил получить несколько гамма-линий сахарной свеклы, обладающих признаками факультативного апомиксиса и способностью закреплять признак ЦМС. Продуктивность созданных гибридов на основе использования апомиктической линии γ-MC-2113 достигала по урожаю корнеплодов 122.2 %, по сахаристости – 104.5 % по сравнению с контролем (Богомолов, 2010). В настоящее время данный растительный материал используется в селекционной работе.

Спорофитный апомиксис. Этот вид апогаметии основан на развитии зародышей из соматических клеток материнского растения с диплоидным набором хромосом, входящих в состав нуцеллуса, интегументов, эндосперма материнского растения или клеток дочернего зародыша, полученного при оплодотворении (Батыгина, 2010). В процессе экспериментов у сахарной свеклы неоднократно была замечена способность к почкованию или расщеплению семязачатка на два или несколько новых. В результате в семенах происходило образование нескольких зародышей, имеющих различную наследственность: половой зародыш и зародыши, формирующиеся из соматических клеток нуцеллуса или интегументов. Зародыши, возникающие из ядер эндосперма, наблюдались обычно в халазальном конце зародышевого мешка при создании

полиплоидных и анеуплоидных форм сахарной свеклы (Ярмолук и др., 1990).

Выявленные особенности формирования зародышей свидетельствуют, что половой и бесполой способы семенной репродукции, существуя совместно, приводят к значительной разнокачественности семенного материала (Зайковская, Перетягко, 1977). В таких случаях возникает генетическое разнообразие линейного материала, вызывающее определенные трудности при создании гибридов.

Эмбриоидогения. Данный тип репродукции растительных организмов отражает особую категорию вегетативного размножения. Структурной единицей этого типа считается *эмбриоид* (соматический зародыш), являющийся, как и половой зародыш, зачатком нового организма, а не частью его (почка, лист, корень), как это наблюдается при черенковании путем гемморизогенеза (Батыгина, 2010). В зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении выделяют две основные формы эмбриоидогении: флоральную и вегетативную.

Флоральная эмбриоидогения у сахарной свеклы является процессом формирования зародышей из гаплоидных ядер зародышевого мешка (яйцеклетка, синергиды, антиподы), а также из клеток диплоидных тканей семязачатка (нукеллус, интегументы и эндосперм). Так, эмбриологические исследования при культивировании *in vitro* неоплодотворенных семязачатков позволили выявить этапы формирования гаплоидных зародышей (Подвигина, 2010; Tomaszevska-Sowa et al., 2017). Наблюдаемое деление гаплоидных клеток яйцевого аппарата или антипод приводило к образованию многоклеточного проэмбрио, сходного с развитием зародыша, образовавшегося половым путем. Этот прием дал возможность получать от растений-доноров (в 5–6 раз быстрее) генетически и морфологически разнообразный материал с высоким уровнем гомозиготности. Настоящие исследования послужили основой ускоренного создания гомозиготных линий, которые нашли широкое применение в селекции сахарной свеклы (Батыгина, 2010; Kikindonov et al., 2016; Lamaoui et al., 2018; Pazuki et al., 2018).

Вегетативная эмбриоидогения основана на формировании эмбриоидов из соматических клеток вегетативных органов растений. Так, культивирование *in vitro* черешков листьев сахарной свеклы на питательной среде Мура-сиге–Скуга, дополненной 6-БАП (0.2–0.3 мг/л) и 2.4-D (0.1 мг/л), стимулировало морфологическое развитие проростков из эпидермальных клеток черешка, напоминающее этапы формирования половых клеток зародышевого мешка. Сначала наблюдалось образование от одной до нескольких инициальных клеток, похожих на половые клетки зародышевого мешка. Характерными для них были более плотная цитоплазма и крупное ядро с ядрышком. Инициальная клетка делилась поперечно с образованием клеток будущего корня. В результате дальнейших делений происходило развитие зародышеподобных структур – эмбриоидов, преобразующихся в проростки (Богомоллова, Жужжалова, 1998). Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, которые также наблюдали развитие структурных элементов, похожих на гипокотиль с листьями, из клеток эпидермиса на адекват-

сальной поверхности культивируемых черешков сахарной свеклы (Mahmoud et al., 2017).

Партеногенез. Эта форма апомиктического размножения включает развитие зародышей или из яйцеклетки без участия мужской гаметы, или из спермия – без участия яйцеклетки (Малецкий, 2005). Согласно современным представлениям, партеногенетическое развитие зародыша сахарной свеклы относится к эпигенетической форме наследственности и изменчивости. Она связана с получением клетками семязачатков цветущих растений внешних или внутренних сигналов, позволяющих перейти от одной программы развития к другой. Изучение форм свеклы с дефектной пыльцой (ЦМС) в полевых условиях показало, что уровень репродукции семян был равен двуродительскому способу или превышал его. В партеногенетических семенных потомствах с высокой частотой встречались семена с гаплоидным набором хромосом. Доля гаплоидов, составляя 3–10 % от числа проросших семян, была на 4 порядка выше, чем при обычном спонтанном получении семян, и соответствовала уровню гаплоидов в культуре *in vitro* (Малецкий и др., 2015). В то же время следует отметить, что получение гаплоидов в партеногенетических потомствах на 3–4 порядка дешевле, чем при получении *in vitro*.

Дальнейшие исследования партеногенеза могут открыть новые возможности в селекции, так как резко упрощают и удешевляют процессы создания МС-гибридов. Это позволяет предположить, что получение гаплоидов данным способом может стать одним из самых эффективных приемов селекции у сахарной свеклы. Реализация того или иного типа воспроизведения и размножения у растений свеклы обеспечивается потенциальными возможностями системы репродукции вида, что позволяет сохранять гомеостаз вида и популяции в целом.

Заключение

Специфика приемов репродуктивной биологии сахарной свеклы состоит в многовариантности образования у растений новых свойств и признаков. Прегенеративный период развития оказался наиболее подходящим для вегетативного размножения и создания селекционного материала, обладающего способностью воспроизводить ценные свойства на основе использования методов партикуляции и микрклонального размножения. Эти методы – один из резервов системы репродукции, в сочетании с семенным размножением обеспечивают пластичность организма, сохраняя в полевых условиях генотип, фенотип, плоидность и другие ценные свойства.

Методы клеточной селекции дают возможность создавать материал, обладающий измененной плоидностью, устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Наиболее разработанными можно считать морфогенетические приемы репродукции, которые сопровождали создание линейного материала с измененными свойствами, повышающими успешный переход от популяционной к гибридной селекции. Большое влияние на формирование различных направлений систем репродукции оказали такие селекционные процессы, как само- и перекрестная несовместимость, ЦМС и апомиксис. Экспериментальные исследования на основе явлений

апогаметии, диплоспории и партеногенеза открывают широкие возможности для работы в области селекции и биотехнологии. Однако методы агамоспермии недостаточно разработаны для применения в селекции.

Исследования апомиктического размножения сахарной свеклы особенно перспективны у растений с ЦМС. Это связано с наследованием отдельных признаков в потомстве гибридов, которое обусловлено передачей генов только от материнского родителя. Цитоплазматическая мужская стерильность сопровождается присутствием в цитоплазме клеток двух типов внутриклеточных органелл (митохондрии и хлоропласты с собственным генетическим материалом мт-ДНК и хл-ДНК). Цитологические и молекулярно-генетические исследования сахарной свеклы с ЦМС перспективны, так как в агамоспермных потомствах можно выявить гено- и фенотипический полиморфизм. Это позволяет применять инновационные технологии в селекционной работе для создания гомозиготного материала сахарной свеклы с новыми признаками.

Список литературы / References

- Агафонов Н.С., Богомолов М.А., Жужжалова Т.П., Корниенко А.В., Федулова Т.П., Попова И.Р. Способ получения гомозиготных линий сахарной свеклы. Авторское свидетельство 1708210 СССР. МКИ АОЛН 1/04. № 4818227/13. Заявл. 12.03.90. Опубл. 30.01.92. Бюл. № 4. 1992.
[Agafonov N.S., Bogomolov M.A., Zhuzhzhhalova T.P., Kornienko A.V., Fedulova T.P., Popova I.R. Method for obtaining sugar beet homozygous lines. Inventor's certificate 1708210 USSR. MКИ АОЛН 1/04. No. 4818227/13. Applied 12.03.90. Published 30.01.92. Bulletin No. 4. 1992. (in Russian)]
- Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск, 1993.
[Atanasov A. Biotechnology in Plant Industry. Novosibirsk, 1993. (in Russian)]
- Балков И.Я., Каракотов С.Д., Логвинов А.В., Логвинов В.А., Мищенко В.Н. Эволюция сахарной свеклы: от огородных форм до современных рентабельных гибридов. Щелково, 2017.
[Balkov I.Ya., Karakotov S.D., Logvinov A.V., Logvinov V.A., Mishchenko V.N. Evolution of Sugar Beet: from Garden Forms to Modern Profitable Hybrids. Shchelkovo, 2017. (in Russian)]
- Бартенев И.И., Гаврин Д.С., Нечаева О.М., Сениутин А.А. Разнообразие популяций семенных растений и качественные показатели семян сахарной свеклы. *Сахар*. 2018;10:46-49.
[Bartenev I.I., Gavrin D.S., Nechaeva O.M., Senyutin A.A. Heterogeneity of seed plant populations and quality indicators of sugar beet seeds. *Sakhar = Sugar*. 2018;10:46-49. (in Russian)]
- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: МГУ, 2004.
[Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatkov A.G., Dzhaliylova Kh.Kh., Ilyina G.M., Chubatova N.V. Handbook of Botanical Microprocedures: Grounds and Methods. Moscow: Moscow State University Publ., 2004. (in Russian)]
- Батыгина Т.Б. Нетрадиционные представления о типах и способах репродукции. Феномен эмбриодогении, новая категория вегетативного размножения цветковых растений. В: Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции: Матер. Междунар. конф., посвящ. 50-летию юбилею Лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии. Санкт-Петербург, 13-16 декабря 2010 г. М., 2010; 26-31.
[Batygina T.B. Nontraditional views of reproduction types and methods. Phenomenon of embryodogeny, a new way of flowering plant propagation. In: Developmental Biology: Morphogenesis of Reproductive Structures and the Role of Somatic and Stem Cells in Development and Evolution: Proc. Intern. Conf., Dedicated to the 50th Anniversary of the Laboratory of Embryology and Reproductive Biology. St. Petersburg, December 13-16, 2010. Moscow, 2010; 26-31. (in Russian)]
- Батыгина Т.Б., Виноградова Г.Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян. *Онтогенез*. 2007;38(3):166-191.
[Batygina T.B., Vinogradova G.Yu. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russ. J. Dev. Biol.* 2007;38:126-151. DOI 10.1134/S1062360407030022.]
- Богомолов М.А. Индуцированный апомиксис и использование его в селекции сахарной свеклы. В: Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010;504-513.
[Bogomolov M.A. Induced apomixis and its use in sugar beet breeding. In: Encyclopedia of the *Beta* Genus: Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sov Publ., 2010;504-513. (in Russian)]
- Богомолова Н.М., Жужжалова Т.П. Изучение соматического эмбриодогенеза у сахарной свеклы (*B. vulgaris* L.). В: Проблемы ботаники на рубеже XX–XXI веков. Т. 1. СПб.: Ботанический институт РАН, 1998;103.
[Bogomolova N.M., Zhuzhzhhalova T.P. Study of somatic embryodogenesis in sugar beet (*B. vulgaris* L.). In: Issues of Botanical Sciences at the Turn of the 21st Century. V. 1. St. Petersburg: Botanical Institute RAS Publ., 1998;103. (in Russian)]
- Брагин А.Г., Иванов М.К., Федосеева Л.А., Дымшиц Г.М. Анализ гетероплазматического состояния митохондриальной ДНК фертильных и мужскостерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011;15(3):524-530.
[Bragin A.G., Ivanov M.K., Fedoseeva L.A., Dymshits G.M. Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmy in fertile and owen CMS sugar beet (*Beta vulgaris*) plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(3):524-530. (in Russian)]
- Вайсман Н.Я., Жужжалова Т.П., Агафонов Н.С. Цитология несовместимости у сахарной свеклы. В: Генетика сахарной свеклы. Новосибирск: Наука, 1984;121-129.
[Vaisman N.Ya., Zhuzhzhhalova T.P., Agafonov N.S. Cytology of incompatibility in sugar beet. In: Sugar Beet Genetics. Novosibirsk: Nauka Publ., 1984;121-129. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О. Ускоренное получение новых гомозиготных линий сахарной свеклы (*B. vulgaris* L.). *Сахар*. 2020a;2:30-32. DOI 10.24411/2413-5518-2020-10203.
[Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kolesnikova E.O. Rapid raise of new sugar beet (*B. vulgaris* L.) homozygous lines. *Sakhar = Sugar*. 2020a;2:30-32. DOI 10.24411/2413-5518-2020-10203. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Ткаченко О.В. Изменение морфологических признаков сахарной свеклы под действием этилметансульфоната. *Сахарная свекла*. 2020b;8:2-6. DOI 10.25802/SB.2020.52.38.001.
[Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Tkachenko O.V. Changes in morphological characteristics of sugar beet under the action of ethylmethanesulphonate. *Sackarnaya Svekla = Sugar Beet*. 2020b;8:2-6. DOI 10.25802/SB.2020.52.38.001. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Федорин Д.Н., Джавахия В.Г. Использование гена *MF2* для трансформации растений сахарной свеклы. В: Современные иммунологические исследования, их роль в создании новых сортов и интенсификация растениеводства. Большие Вяземы, 2009;162-168.
[Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Fedorin D.N., Dzhavakhiya V.G. Use of the *MF2* gene for transformation of sugar beet plants. In: Modern Immunology Studies and Their Role in Development of New Varieties and Intensification of Plant Growing. Bolshie Vyazemy, 2009;162-168. (in Russian)]

- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Федорин Д.Н., Землянухина О.А. Молекулярные и биохимические свойства трансгенных растений сахарной свеклы. В: Материалы докладов V Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биохимические свойства, применение, биобезопасность». Москва. 1-4 декабря 2014 г. М., 2014;63-66. [Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Fedorin D.N., Zemlyanukhina O.A. Molecular and biochemical properties of transgenic sugar beet plants. In: Proceedings of the 5th All-Russian Symposium "Transgenic Plants: Development Technologies, Biochemical Properties, Use, and Biosafety". Moscow. December 1-4, 2014. Moscow, 2014;63-66. (in Russian)]
- Вишнякова М.А. Возможные пути эволюции структурных механизмов реакции самонесовместимости у покрытосеменных. В: Проблемы ботаники на рубеже XX–XXI веков. Т. 1. СПб.: Ботанический институт РАН, 1998;107-108. [Vishnyakova M.A. Possible ways of structural mechanisms underlying the evolution of self-incompatibility reaction in angiosperm plants. In: Issues of Botanical Sciences at the Turn of the 21st Century. St. Petersburg: Botanical Institute RAS Publ., 1998;107-108. (in Russian)]
- Дубровная О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. *Физиология растений и генетика*. 2017;49(4):279-292. [Dubrovna O.V. *In vitro* selection of wheat for resistance to abiotic stress factors. *Fiziologiya Rastenij i Genetika = Plant Physiology and Genetics*. 2017;49(4):279-292. (in Russian)]
- Дымшиц Е.М., Брагин А.Г., Иванов М.К. Молекулярно-генетические аспекты цитоплазматической мужской стерильности. В: Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010;228-247. [Dymshits E.M., Bragin A.G., Ivanov M.K. Molecular aspects of cytoplasmic male sterility. In: Encyclopedia of the *Beta* Genus. Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sov Publ., 2010;228-247. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Подвигина О.А., Ярмолюк Г.И. Репродуктивная биология сахарной свеклы. Воронеж: ООО «Сотрудничество», 2007. [Zhuzhzhhalova T.P., Znamenskaya V.V., Podvigina O.A., Yarmolyuk G.I. Reproduction Biology of Sugar Beet. Voronezh: Sotrudnichestvo Publ., 2007. (in Russian)]
- Зайковская Н.Э., Жужжалова Т.П. Развитие пыльцевых трубок у самофертильных и самостерильных линий сахарной свеклы при изоляции. *Цитология и генетика*. 1976;10(1):57-61. [Zaykovskaya N.E., Zhuzhzhhalova T.P. Development of pollen tubes in isolated self-fertile and self-sterile sugar beet lines. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 1976;10(1):57-61. (in Russian)]
- Зайковская Н.Э., Перетятко Н.А. Апомиктичное развитие семян у сахарной свеклы. В: Теоретические основы и практические приемы выращивания сахарной свеклы и других культур. Киев: ВНИС, 1977;19-21. [Zaykovskaya N.E., Peretyat'ko N.A. Apomictic development of sugar beet seeds. In: Fundamentals and Practical Methods of the Growing of Sugar Beet and Other Crops. Kiev: All-Ukraine Institute of Breeding, 1977;19-21. (in Russian)]
- Знаменская В.В. Микрочлонирующее *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы. В: Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010;420-437. [Znamenskaya V.V. *In vitro* microcloning as a method of maintenance and propagation of sugar beet lines. In: Encyclopedia of the *Beta* Genus: Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sov Publ., 2010;420-437. (in Russian)]
- Знаменская В.В., Жужжалова Т.П. Использование микрочлониального размножения и сохранения ценных генотипов сахарной свеклы для ускорения селекционного процесса. В: Использование биотехнологических методов в селекции сахарной свеклы. Киев, 1989;52-58. [Znamenskaya V.V., Zhuzhzhhalova T.P. Use of microclonal propagation and maintenance of valuable sugar beet genotypes to accelerate breeding. In: Use of Biotechnological Methods in Sugar Beet Breeding. Kiev, 1989;52-58. (in Russian)]
- Ильенко И.Н. Микрочлониальное размножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре *in vitro*. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1983;15(4):351-355. [Ilyenko I.I. Microclonal propagation and maintenance of sugar beet breeding material in *in vitro* culture. *Fiziologiya i Biokhimiya Kkulturnykh Rasteniy = Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*. 1983;15(4):351-355. (in Russian)]
- Каракотов С.Д., Апасов И.В., Налбандян А.А., Васильченко Е.Н., Федулова Т.П. Современные аспекты селекции гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(4):394-400. DOI 10.18699/VJ2.043. [Karakotov S.D., Apasov I.V., Nalbandyan A.A., Vasilchenko E.N., Fedulova T.P. Modern issues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hybrid breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(4):394-400. DOI 10.18699/VJ2.043. (in Russian)]
- Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. [Katayeva N.V., Butenko R.G. Clonal Micropropagation of Plants. Moscow: Nauka Publ., 1983. (in Russian)]
- Ковалева Л.В. Межклеточные взаимодействия в системе пыльца-пестик в прогамной фазе оплодотворения. *Усп. соврем. биологии*. 1991;111(5):782-796. [Kovaleva L.V. Intercellular interactions of the pollen-pistil system in the progamic phase of fertilization. *Uspekhi Sovremennoj Biologii = Advances in Current Biology*. 1991;111(5):782-796. (in Russian)]
- Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Воронков А.С., Тимофеева Г.В., Минкина Ю.В. Фитогормоны и полярный рост пыльцевой трубки. В: Эмбриология, генетика и биотехнология. Материалы V Международной школы для молодых ученых (Санкт-Петербург, 9-14 октября 2016 г.). СПб.: Левша, 2016;106. [Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Voronkov A.S., Timofeyeva G.V., Minkina Yu.V. Plant hormones and polar growth of pollen tubes. In: Embryology, Genetics, and Biotechnology. Proceedings of the 5th International School for Young Scientists (St. Petersburg, October 9-14, 2016). St. Petersburg: Levsha Publ., 2016;107.]
- Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П. Микрочлонирующее и сохранение линейного материала в селекционном процессе сахарной свеклы. В: Материалы IV (XII) Международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге 22-28 апреля 2018 г. СПб.: БИН РАН, 2018;267-268. [Kolesnikova E.O., Zhuzhzhhalova T.P. Microcloning and maintenance of lines material in sugar beet breeding process. In: Proc. of IV (XII) Int. Botanical Conf. of Young Scientists in St. Petersburg, April 22-28, 2018. St. Petersburg: Komarov Botanical Institute of the RAS, 2018;267-268.]
- Корниенко А.В., Знаменская В.В. Новые методы создания исходного материала сахарной свеклы. Рамонь, 2001. [Kornienko A.V., Znamenskaya V.V. New Methods for Obtaining Sugar Beet Parent Material. Ramon', 2001. (in Russian)]
- Корниенко А.В., Подвигина О.А., Жужжалова Т.П., Федулова Т.П., Богомолов М.А., Ошевнев В.П., Буторина А.К. Приоритетные направления по генетике и селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в XXI веке. *Генетика*. 2014;50(11):1286-1298. DOI 10.7868/S001667581411006X. [Kornienko A.V., Podvigina O.A., Zhuzhzhhalova T.P., Fedulova T.P., Bogomolov M.A., Oshevnev V.P., Butorina A.K. High-priority research directions in genetics and the breeding of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in the 21st century. *Russ. J. Genet.* 2014;50(11):1137-1148. DOI 10.1134/S1022795414110064.]

- Лейке Г., Лабес Р., Эртель К., Петерсдорф М. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала. М.: Колос, 1980.
- [Leyke G., Labes R., Ertel K., Peteresdorf M. Using of Tissue and Organ Cultures in Plant Breeding and Planting Material Production. Moscow: Kolos Publ., 1980. (in Russian)]
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во «Н-Л», 2010.
- [Lutova L.A., Ezhova T.A., Dodueva I.E., Osipova M.A. Genetics of Plant Development. St. Petersburg: N-L Publ., 2010. (in Russian)]
- Мазлумов А.Л. Селекция сахарной свеклы. М.: Колос, 1970.
- [Mazlumov A.L. Sugar Beet Breeding. Moscow: Kolos Publ., 1970. (in Russian)]
- Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Гаплоиды в апозиготических потомствах сахарной свеклы. В: Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010;466-472.
- [Maletskaya E.I., Maletskiy S.I. Haploidy in apozygotic progeny of sugar beet. In: Encyclopedia of the *Beta* Genus: Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010;466-472. (in Russian)]
- Малецкий С.И. Эволюционная биология. Словарь терминов. Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 2005.
- [Maletskiy S.I. Evolution Biology. Dictionary of Terms. Novosibirsk: ICG SB RAS Publ., 2005. (in Russian)]
- Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Генетика*. 1996;32(12):1643-1650.
- [Maletskii S.I., Maletskaya E.I. Self-fertility and agamospermy in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Russ. J. Genet.* 1996;32(12):1431-1437.]
- Малецкий С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С. Новая технология воспроизводства семян у сахарной свеклы (партеногенетический способ). *Труды Кубан. гос. агр. ун-та*. 2015;54:204-213.
- [Maletskiy S.I., Maletskaya E.I., Yudanov S.S. New technology of seeds reproduction in sugar beets (parthenogenetic mode). *Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Works of the Kuban State Agrarian University*. 2015;3(54):204-213. (in Russian)]
- Налбандян А.А., Федулова Т.П., Хуссейн А.С. Молекулярный отбор селекционного материала сахарной свеклы с генами устойчивости к биотическим стрессам. *Рос. с.-х. наука*. 2019;1:16-20. DOI 10.31857/S2500-26272019116-20.
- [Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Khussein A.S. Molecular selection of sugar beet breeding material with genes of resistance to biotic stresses. *Rossiyskaya Sel'skokhozyaystvennaya Nauka = Russian Agricultural Science*. 2019;1:16-20. DOI 10.31857/S2500-26272019116-20. (in Russian)]
- Налбандян А.А., Федулова Т.П., Черепухина И.В., Крюкова Т.И., Ошевнев В.П., Грибанова Н.П. ДНК-маркеры в селекции сахарной свеклы. *Сахарная свекла*. 2021;2:10-14. DOI 10.25802/SB.2021.57.87.001.
- [Nalbandyan A.A., Fedulova T.P., Cherepukhina I.V., Kryukova T.I., Oshevnev V.P., Gribanova N.P. DNA markers in sugar beet breeding. *Sackarnaya Svekla = Sugar Beet*. 2021;2:10-14. DOI 10.25802/SB.2021.57.87.001. (in Russian)]
- Налбандян А.А., Хуссейн А.С., Федулова Т.П., Черепухина И.В., Крюкова Т.И., Руденко Т.С., Михеева Н.Р., Моисеенко А.В. Дифференциация сортообразцов сахарной свеклы по SSR-маркерам для создания перспективных гибридов. *Рос. с.-х. наука*. 2020;4:18-21. DOI 10.31857/S2500262720040043.
- [Nalbandyan A.A., Khussein A.S., Fedulova T.P., Cherepukhina I.V., Kryukova T.I., Rudenko T.S., Mikheeva N.R., Moiseenko A.V. Differentiation of sugar beet cultivars by SSR markers to create promising hybrids. *Rossiyskaya Sel'skokhozyaystvennaya Nauka = Russian Agricultural Science*. 2020;4:18-21. DOI 10.31857/S2500262720040043. (in Russian)]
- Ошевнев В.П., Грибанова Н.П. Селекция самосовместимых опылителей О-типа у сахарной свеклы. В: Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010;542-554.
- [Oshevnev V.P., Gribanova N.P. Breeding of O-type self-compatible pollinators in sugar beet. In: Encyclopedia of the *Beta* Genus: Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010;542-554. (in Russian)]
- Ошевнев В.П., Грибанова Н.П., Жужжалова Т.П., Черепухин Э.И. Образование пистиллодий у сахарной свеклы. *Генетика*. 1986a;22(4):889-891.
- [Oshevnev V.P., Gribanova N.P., Zhuzhzhhalova T.P., Cherepukhin E.I. Formation of pistillodes in sugar beet. *Genetika = Genetics*. 1986a;22(4):889-891. (in Russian)]
- Ошевнев В.П., Черепухин Э.И., Балков И.Я. Использование признака самонесовместимости в селекции сахарной свеклы на основе ЦМС. *С.-х. биология*. 1986b;21(8):90-92.
- [Oshevnev V.P., Cherepukhin E.I., Balkov I.Ya. Use of the self-incompatibility trait in sugar beet breeding on the CMS base. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1986b;21(8):90-92. (in Russian)]
- Подвигина О.А. Индуцирование гаплоидии из неоплодотворенных семязпочек сахарной свеклы в условиях *in vitro*. В: Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Изд-во «Сова», 2010;455-465.
- [Podvigina O.A. *In vitro* induction of haploidy from unfertilized sugar beet ovules. In: Encyclopedia of the *Beta* Genus: Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010;455-465. (in Russian)]
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр, 2007.
- [Titov A.F., Talanova V.V., Kaznina N.M., Laydinen G.F. Heavy metal tolerance in plants. Petrozavodsk: Karelian Scientific Centre Publ., 2007. (in Russian)]
- Федулова Т.П., Налбандян А.А., Дуванова Т.Н. Скрининг исходных материалов сахарной свеклы на наличие минисателлитных локусов TRs, связанных с ЦМС. *Сахар*. 2022;3:38-41. DOI 10.24412/2413-5518-2022-3-38-41.
- [Fedulova T.P., Nalbandyan A.A., Duvanov T.N. Screening of sugar beet parental materials for the presence of TRs minisatellite loci associated with CMS. *Sakhar = Sugar*. 2022;3:38-41. DOI 10.24412/2413-5518-2022-3-38-41. (in Russian)]
- Фоменко Н.Р., Жужжалова Т.П., Федулова Т.П., Богомолов М.А. Цитозмриологическая и морфологическая характеристика растений апоиктичных гамма-линий сахарной свеклы. В: Факторы экспериментальной эволюции организмов. Киев: Аграрная наука, 2003;212-217.
- [Fomenko N.P., Zhuzhzhhalova T.P., Fedulova T.P., Bogomolov M.A. Cytoembryological and morphological characterization of plants in apomictic gamma lines of sugar beet. In: Factors of the Experimental Evolution of Organisms. Kiev: Agrarnaya Nauka Publ., 2003; 212-217. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):1044-1054.
- [Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):1044-1054. (in Russian)]
- Хуссейн А.С., Михеева Н.Р., Налбандян А.А., Черкасова Н.Н. Скрининг растений-регенерантов сахарной свеклы на наличие гена устойчивости к тяжелым металлам МТР4. *Биотехнология*. 2021;37(4):14-19. DOI 10.21519/0234-2758-2021-37-4-14-19.
- [Khussein A.S., Mikheeva N.R., Nalbandyan A.A., Cherkasova N.N. Screening of sugar beet regenerants for the heavy metal resistance MTP4 gene. *Biotechnologiya = Biotechnology*. 2021;37(4):14-19. DOI 10.21519/0234-2758-2021-37-4-14-19. (in Russian)]

- Хуссейн А.С., Налбандян А.А., Богачева Н.Н., Васильченко В.Н., Федулова Т.П. Микросателлитный анализ трансгенных форм сахарной свеклы. *Докл. Рос. академии с.-х. наук*. 2013;2:17-20. [Khussein A.S., Nalbandyan A.A., Bogacheva N.N., Vasilchenko E.N., Fedulova T.P. Microsatellite analysis of transgenic forms of sugar beet. *Doklady Rossiyskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2013;2:17-20. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О. Разработка технологии селективного отбора *in vitro* регенерантов сахарной свёклы с устойчивостью к кислотности и засухе. *Сахар*. 2018;10:43-45. [Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kolesnikova E.O. Development of a technology to select sugar beet *in vitro* regenerants for tolerance of acidity and drought. *Sakhar = Sugar*. 2018;10:43-45. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О. Влияние ионной токсичности на морфологическое развитие регенерантов сахарной свёклы. *Сахарная свекла*. 2020;5:33-35. DOI 10.25802/SB.2020.94.56.003. [Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kolesnikova E.O. Influence of ionic toxicity on morphological development of sugar beet regenerants. *Sackarnaya Svekla = Sugar Beet*. 2020;5:33-35. DOI 10.25802/SB.2020.94.56.003. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Ткаченко О.В. Повышение устойчивости растений сахарной свеклы к засухе в условиях *in vitro*. *Сахарная свекла*. 2021;8:12-14. DOI 10.25802/SB.2021.52.25.002. [Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Tkachenko O.V. Increasing the resistance of sugar beet plants to drought *in vitro* conditions. *Sackarnaya Svekla = Sugar Beet*. 2021;8:12-14. DOI 10.25802/SB.2021.52.25.002. (in Russian)]
- Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе. М.: Наука, 1992. [Shevelukha V.S. Plant Growth and its Regulation in Ontogenesis. Moscow: Nauka Publ., 1992. (in Russian)]
- Ярмолук Г.И., Ширяева Э.И., Кулик А.Г. Эндоспермальная эмбриония – новая форма апомиксиса у сахарной свеклы. *Докл. ВАСХНИЛ*. 1990;3:4-8-11. [Yarmolyuk G.I., Shiryayeva E.I., Kulik A.G. Endospermal embryony, a new form of apomixis in sugar beet. *Doklady VASKHNIL = Reports of the Academy of Agricultural Sciences*. 1990;3:4-8-11. (in Russian)]
- Banzal K.C., Lenka S.K., Mondal T.K. Genomic resources for breeding crops with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Breed*. 2014; 133(1):1-11. DOI 10.1111/pbr.12117.
- Bednarska E. The effect of intracellular calcium level regulators on the synthesis of pollen tube callose in *Oenothera biennis* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1989;58(2):199-210. DOI 10.5586/asbp.1989.016.
- Dzhavakhia V., Filippov A., Skryabin K., Voinova T., Kouznetsova M., Shulga O., Shumilina D., Kromina K., Pridanniko M., Battchikova N., Korpela T. Proteins inducing multiple resistance of plants to phytopathogens and pests. US patent No. WO 2005061533. Intern. Filing Date 17.12.2004. Publ. Date 07.07.2005.
- Hohmann U., Jacobs G., Jung C. An EMC mutagenesis protocol for sugar beet and isolation non-bolting mutants. *Plant Breed*. 2005; 124(4):317-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2005.01126.x.
- Kikindonov G., Kikindonov Tz., Erchev S. Economical qualities of crosses between doubled haploid sugar beet lines. *Agric. Sci. Technol.* 2016;8(2):107-110. DOI 10.15547/ast 2016.02.018.
- Kourelis J., van der Hoorn R.A.L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell*. 2018;30(2):285-299. DOI 10.1105/tpc.17.00579.
- Lamaoui M., Jemo M., Datla R., Bekkaoui F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Front. Chem.* 2018; 6:26. DOI 10.3389/fchem.2018.00026.
- Larsen K. Self-incompatibility in *Beta vulgaris* L. Four gametophytic, complementary S-loci in sugar beet. *Hereditas*. 1977;85(2):227-248. DOI 10.1111/j.1601-5223.1977.tb00971.x.
- Mahmoud K., Najar A., Jedid E., Jemai N., Jemmali A. Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *J. New Sci.* 2017;47(2):2564-2576.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 2000;123(2):439-442. DOI 10.1104/pp.123.2.439.
- Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1974;25:135-166. DOI 10.1146/annurev.pp.25.060174.001031.
- Nishizawa S., Kubo T., Mikami T. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets. *Curr. Genet.* 2000; 37(1):34-38. DOI 10.1007/s002940050005.
- Owen F.V. Mendelian male sterility in sugar beets. *Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 1952;7:371-376.
- Paesold S., Borchardt D., Schmidt T., Dechryeva D. A sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reference FISH karyotype for chromosome and chromosome-arm identification, integration of genetic linkage groups and analysis of major repeat family distribution. *Plant J.* 2012;72(4): 600-611. DOI 10.1111/j.1365-313X.2012.05102.x.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel E., Ergül A., Gürel S. Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pretreatment. *Sugar Tech.* 2018;20: 69-77. DOI 10.1007/s12355-017-0522-x.
- Rusea I., Popescu A., Valentina I., Hoza D. Micropropagation of strawberry cv. Magic. *Ann. Univ. Craiova*. 2020;XXIV(LX):218-223.
- Seman I., Farago J. Research biotechnological methods in sugar beet breeding in the research and breeding institute at Bucany. *Potsdam. Forsh. B.* 1988;57:51-56.
- Simko I., Eujayl I., van Hintum T.J. Empirical evaluation of DArT, SNP, and SSR marker-systems for genotyping, clustering, and assigning sugar beet hybrid varieties into populations. *Plant Sci.* 2012;184: 54-62. DOI 10.1016/j.plantsci.2011.12.009.
- Stevanato P., Trebbi D., Panella L., Richardson K., Droccanelo C., Pakish L., Fenwick A., Saccomani M. Identification and validation of a SNP marker linked to the gene *HsBvm-1* for nematode resistance in sugar beet. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015;33:474-479. DOI 10.1007/s11105-014-0763-8.
- Tomaszevska-Sowa M., Figas A.S., Gatz A. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis during shoot formation in sugar beet (*B. vulgaris* L.) via gynogenesis. *Polish J. Nat. Sci.* 2017;32(4):705-717.

ORCID ID

A.A. Nalbandyan orcid.org/0000-0001-5959-047X

Благодарности. Работы выполнены в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.01.2022. После доработки 02.02.2023. Принята к публикации 02.02.2023.

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

Оценка роли отбора в эволюции митохондриальных геномов коренного населения Сибири

Б.А. Малярчук , М.В. Деренко

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

 malyarchuk@ibpn.ru

Аннотация. Исследования характера изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) в популяциях человека выявили, что белок-кодирующие гены находятся под действием отрицательного (очищающего) отбора, поскольку мутационные спектры генов мтДНК характеризуются выраженным преобладанием синонимичных замен над несинонимичными (величина параметра $Ka/Ks < 1$). Между тем в ряде исследований показано, что адаптация популяций к различным условиям природной среды может сопровождаться ослаблением отрицательного отбора в некоторых генах мтДНК. Так, ранее было установлено, что в арктических популяциях отрицательный отбор ослаблен в митохондриальном гене *ATP6*, кодирующем одну из субъединиц АТФ-синтазы. В настоящей работе проведен Ka/Ks -анализ митохондриальных генов в больших выборках трех региональных групп населения Евразии: Сибири ($N = 803$), Западной Азии/Закавказья ($N = 753$) и Восточной Европы ($N = 707$). Основная цель работы – поиск следов адаптивной эволюции в генах мтДНК коренного населения Сибири, представленного населением севера (коряки, эвены) и юга Сибири и прилегающей территории Северо-Восточного Китая (буряты, баргуты, хамниганы). С помощью стандартного Ka/Ks -анализа установлено, что все гены мтДНК во всех изученных региональных группах населения испытывают действие отрицательного отбора. Наиболее высокие значения Ka/Ks в различных региональных выборках обнаружены практически в одном и том же наборе генов, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы (*ATP6*, *ATP8*), НАДН-дегидрогеназного комплекса (*ND1*, *ND2*, *ND3*) и цитохром *bc₁*-комплекса (*CYB*). Самое высокое значение Ka/Ks , указывающее на ослабление отрицательного отбора, выявлено в гене *ATP6* в сибирской группе. Результаты анализа, выполненного с помощью метода FUBAR (пакет программ HyPhy) и направленного на поиск кодонов мтДНК, находящихся под действием отбора, также показали преобладание влияния отрицательного отбора над положительным отбором во всех группах населения. В сибирских популяциях нуклеотидные позиции, находящиеся под действием положительного отбора и ассоциированные с гаплогруппами мтДНК, зарегистрированы не на севере (что ожидается в предположении адаптивной эволюции мтДНК), а на юге Сибири.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК; естественный отбор; Ka/Ks -тесты; популяции человека; Сибирь.

Для цитирования: Малярчук Б.А., Деренко М.В. Оценка роли отбора в эволюции митохондриальных геномов коренного населения Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):218-223. DOI 10.18699/VJGB-23-28

Evaluating the role of selection in the evolution of mitochondrial genomes of aboriginal peoples of Siberia

B.A. Malyarchuk , M.V. Derenko

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

 malyarchuk@ibpn.ru

Abstract. Studies of the nature of mitochondrial DNA (mtDNA) variability in human populations have shown that protein-coding genes are under negative (purifying) selection, since their mutation spectra are characterized by a pronounced predominance of synonymous substitutions over non-synonymous ones ($Ka/Ks < 1$). Meanwhile, a number of studies have shown that the adaptation of populations to various environmental conditions may be accompanied by a relaxation of negative selection in some mtDNA genes. For example, it was previously found that in Arctic populations, negative selection is relaxed in the mitochondrial *ATP6* gene, which encodes one of the subunits of ATP synthase. In this work, we performed a Ka/Ks analysis of mitochondrial genes in large samples of three regional population groups in Eurasia: Siberia ($N = 803$), Western Asia/Transcaucasia ($N = 753$), and Eastern Europe ($N = 707$). The main goal of this work is to search for traces of adaptive evolution in the mtDNA genes of aboriginal peoples of Siberia represented by populations of the north (Koryaks, Evens) and the south of Siberia and the adjacent territory of Northeast China (Buryats, Barghuts, Khamnigans). Using standard Ka/Ks analysis, it was found that all mtDNA genes in all studied regional population groups are subject to negative selection. The highest Ka/Ks values in different regional samples were found in almost the same set of genes encoding subunits of ATP synthase (*ATP6*, *ATP8*), NADH dehydrogenase complex (*ND1*, *ND2*, *ND3*), and cytochrome *bc₁* complex (*CYB*). The highest Ka/Ks value, indicating a relaxation of negative selection, was found in the *ATP6* gene in the Siberian group. The results of the analysis performed using the FUBAR method (HyPhy software package) and aimed at searching for mtDNA codons under the influence of selection also showed the

predominance of negative selection over positive selection in all population groups. In Siberian populations, nucleotide sites that are under positive selection and associated with mtDNA haplogroups were registered not in the north (which is expected under the assumption of adaptive evolution of mtDNA), but in the south of Siberia.

Key words: mitochondrial DNA; natural selection; Ka/Ks-testing; human populations; Siberia.

For citation: Malyarchuk B.A., Derenko M.V. Evaluating the role of selection in the evolution of mitochondrial genomes of aboriginal peoples of Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3): 218-223. DOI 10.18699/VJGB-23-28

Введение

Митохондриальная ДНК (мтДНК) является отличным инструментом для исследования эволюционной истории человечества, что связано с такими особенностями генома митохондрий, как наследование по материнской линии без рекомбинаций и высокая, в сравнении с ядерным геномом, скорость накопления мутаций (Brown et al., 1979; Giles et al., 1980). Постепенное накопление мутаций в гаплотипах мтДНК приводит к формированию групп филогенетически родственных гаплотипов (т.е. гаплогрупп мтДНК), которые характеризуются популяционно-специфичным распределением (Wallace, 1995). Сначала были обнаружены континентальные макрогаплогруппы, а позже, по мере увеличения разрешающей способности анализа мтДНК – от секвенирования отдельных участков мтДНК до последовательностей целых митогеномов, были выявлены этноспецифичные гаплогруппы мтДНК (Olivieri et al., 2017; Derenko et al., 2019; García et al., 2020).

Результаты популяционно-генетических исследований последних 20 лет свидетельствуют о большом значении отрицательного отбора в функционировании генома митохондрий (Mishmar et al., 2003; Elson et al., 2004; Kivisild et al., 2006; Ingman, Gyllensten, 2007; Sun et al., 2007; Деренко, Мальярчук, 2010; Eltsov et al., 2010; Malyarchuk, 2011; Литвинов и др., 2020). Это обусловлено, прежде всего, большой важностью этой генетической системы, обеспечивающей работу дыхательной цепи митохондрий. Гены, кодирующие субъединицы белковых комплексов дыхательной цепи (НАДН-убихинон-оксидоредуктазного, цитохром *bc₁*, цитохром *c*-оксидазного, АТФ-синтазного), составляют примерно 70 % митохондриального генома. Высокая консервативность этих генов обусловлена существенным преобладанием синонимичных замен в различных генах мтДНК (Ks) над несинонимичными (Ka), приводящими к заменам аминокислот.

В ранних исследованиях показано, что митохондриальные гены могут быть подвержены действию положительного отбора, ведущего к превалированию числа несинонимичных замен над синонимичными, в связи с адаптацией популяций человека к различным условиям природной среды (Mishmar et al., 2003). Так, отклонение от нейтральной модели изменчивости мтДНК было зарегистрировано в различных региональных группах населения Евразии и Америки. Анализ распределения значений Ka/Ks показал, что в арктической зоне отрицательный отбор ослаблен в митохондриальном гене *ATP6*, в умеренной зоне (Европа) – в гене *CYB*, а в тропической зоне – в генах *CO1* и *ND3* (Mishmar et al., 2003; Ingman, Gyllensten, 2007).

Преобладание повышенных значений Ka/Ks в гене *ATP6* у населения арктической зоны (в сибирских и североамериканских популяциях) в сравнении с другими

регионами объяснялось адаптацией популяций к условиям Крайнего Севера (Mishmar et al., 2003). Ген *ATP6* кодирует субъединицу 6 митохондриальной АТФ-синтазы, участвующей в сопряжении процессов продукции АТФ и тепла для поддержания температуры тела, и поэтому предполагается, что варианты полиморфизма, уменьшающие эффективность сопряжения, могут быть выгодны в условиях холодового стресса, поскольку они способствуют увеличению производства тепла и скорости метаболизма в целом (Mishmar et al., 2003).

Позже было выявлено, что повышенные значения Ka/Ks в гене *ATP6* преобладают у восточных азиатов (Elson et al., 2004; Sun et al., 2007). В другом исследовании митохондриальных геномов населения Северной Азии (Ingman, Gyllensten, 2007) также были обнаружены более высокие значения Ka/Ks в гене *ATP6*. Накопление несинонимичных мутаций в этом гене рассматривалось авторами как медленный в эволюционном плане процесс постепенного ослабления отрицательного отбора на протяжении последних нескольких десятков тысяч лет. В пользу такого сценария свидетельствуют и данные о том, что некоторые древние несинонимичные замены маркируют собой гаплогруппы мтДНК, получившие широкое распространение на севере Азии (Ruiz-Pesini et al., 2004). Например, это замена G8584A, маркирующая макрогаплогруппу M8 и ее преимущественно североазиатскую гаплогруппу C; замена C8794T, определяющая гаплогруппу A; замена A8701G, маркирующая макрогаплогруппу N в целом. Предполагается, что такого рода замены мтДНК связаны с изменениями в энергетическом обмене и тем самым способствуют адаптации к северным условиям, будучи потенциальными кандидатами для адаптивного отбора (Ruiz-Pesini et al., 2004).

Другой сценарий, как отмечалось выше, заключается в том, что мутационные изменения в гене *ATP6* произошли в результате ослабления отрицательного отбора, а повышению частоты этих вариантов полиморфизма в северных популяциях поспособствовал дрейф генов, эффекты которого лучше проявляются в популяциях малой эффективной численности (Ingman, Gyllensten, 2007).

Результаты Ka/Ks-анализа митохондриальных генов в раковых тканях продемонстрировали существенное ослабление отрицательного отбора в различных генах мтДНК в условиях аэробного гликолиза, который активно протекает в раковых клетках (Stafford, Chen-Quin, 2010; Liu et al., 2012; Skonieczna et al., 2018). При сопоставлении Ka/Ks-спектров в здоровых и раковых тканях оказалось, что при различных типах рака в митохондриальных генах пораженных клеток наблюдается статистически значимое ослабление отрицательного отбора во всех генах, кроме *ATP6* и *ATP8*, а также *ND3* и *CO2* (Liu et al., 2012). В от-

ношении генов, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы, это означает, что для митохондрий здоровых клеток характерно, по всей видимости, настолько существенное ослабление отрицательного отбора, что оно практически не отличается от такового в условиях канцерогенеза. Однако причины такого поведения митохондриальных генов *ATP6* и *ATP8* в норме до конца не понятны.

Таким образом, результаты исследований характера эволюции белок-кодирующих генов мтДНК в популяциях человека свидетельствуют о достаточно высокой консервативности митохондриальных генов, однако наличие межпопуляционных различий указывает на возможное проявление действия положительного отбора в некоторых генах мтДНК в связи с адаптацией популяций к различным климатическим условиям. В ряде работ этот вопрос рассматривался на примере популяций Восточной Азии, включая коренное население Сибири, однако размеры исследованных выборок были недостаточно репрезентативными (менее 100 полных митогеномов) (Mishmar et al., 2003; Elson et al., 2004; Kivisild et al., 2006; Ingman, Gyllensten, 2007; Sun et al., 2007).

В настоящей работе представлены более полные сведения о влиянии отбора на митохондриальные геномы популяций человека, основанные на результатах Ka/Ks-анализа генов мтДНК у коренного населения Сибири ($N = 803$) в сравнении с населением Западной Азии и Закавказья ($N = 753$) и Восточной Европы ($N = 707$).

Материалы и методы

Проанализированы опубликованные в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) данные об изменчивости целых митохондриальных геномов у коренного населения северной части Сибири, представленного коряками ($N = 154$) и эвенками ($N = 219$), и южной части Сибири и прилегающих территорий Северо-Восточного Китая, представленного монголоязычными бурятами, баргутами и хамниганами ($N = 430$). Для сравнения использованы данные о полиморфизме целых митогеномов в популяциях Западной Азии (персы, кашкайцы, ливанцы) и Закавказья (армяне и азербайджанцы) (суммарно $N = 753$), а также у населения Восточной Европы (русские, украинцы, поволжские татары и эстонцы, $N = 707$).

Анализировали распределение значений Ka/Ks (соотношения числа несинонимичных замен на несинонимичный сайт (Ka) к числу синонимичных замен на синонимичный сайт (Ks)) в кодируемых L-цепью мтДНК генах *ND1*, *ND2*, *CO1*, *CO2*, *ATP8*, *ATP6*, *CO3*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5* и *CYB*. Для Ka/Ks-анализа использовали программы пакета DnaSP v. 5 (Librado, Rozas, 2009). Действие отрицательного отбора предполагается при $Ka/Ks < 1$ и положительного отбора – при $Ka/Ks > 1$. Для анализа действия отбора на белок-кодирующие гены мтДНК использовали также пакет программ HyPhy (<http://www.hyphy.org>) (Kosakovsky Pond et al., 2005). Для выявления кодонов, находящихся под действием отрицательного и положительного отбора, применяли метод Fast Unconstrained Bayesian AppRoximation (FUBAR), позволяющий быстро анализировать большие наборы молекулярных данных с помощью иерархического байесовского метода и метода Монте-Карло для марковских цепей (MCMC) (Murrel et al., 2013).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа распределения значений Ka/Ks в белок-кодирующих генах митохондриального генома в популяциях коренного населения Сибири показали, что во всех, кроме одного, случаях значения этого параметра ниже единицы, что свидетельствует о влиянии отрицательного отбора на гены мтДНК (табл. 1). Наиболее высокие значения Ka/Ks зарегистрированы в гене *ATP6*. Причем у коряков – палеоазиатского народа, сформировавшегося на Северо-Востоке Азии в суровых климатических условиях, значение Ka/Ks превышает единицу, что указывает на действие положительного отбора на этот митохондриальный ген.

В табл. 2 приводятся значения Ka/Ks в трех региональных группах населения. В сибирской группе популяций наиболее высокие значения обнаружены в генах *ATP6*, *ATP8*, *ND2* и *CYB*, в популяциях Западной Азии и Закавказья – в генах *ATP6*, *ATP8*, *ND1*, *ND2* и *CYB*, в популяциях Восточной Европы – в генах *ATP6*, *ATP8*, *ND1*, *ND3* и *CYB*. Таким образом, результаты проведенного анализа свидетельствуют о примерно одинаковом наборе митохондриальных генов, демонстрирующих наиболее высокие значения Ka/Ks в различных регионах Евразии. Максимальные значения этого параметра выявлены в генах, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы, что согласуется с результатами предыдущих исследований (Mishmar et al., 2003; Ingman, Gyllensten, 2007; Sun et al., 2007) и указывает на ослабление отрицательного отбора в генах *ATP6* и *ATP8*, особенно в сибирских популяциях.

Для оценки давления отбора на отдельные сайты с учетом их расположения в филогенетическом дереве гаплотипов мтДНК применяли иерархический байесовский анализ, реализованный в программе FUBAR пакета HyPhy (<http://www.hyphy.org>). Этот метод обладает более высокой эффективностью выявления кодонов, находящихся под действием положительного и отрицательного отборов, например, в сравнении с методами Fixed Effects Likelihood (FEL) и Mixed Effects Model of Evolution (MEME) пакета HyPhy, также широко используемыми для исследования селективных процессов (Murrel et al., 2012, 2013).

Проведенное нами исследование показало, что в популяциях Сибири под действием отрицательного отбора находится 11.4 % (411) кодонов, примерно равномерно распределенных по генам мтДНК. Это согласуется с существующими представлениями о том, что консервативность митохондриальных генов обусловлена их большим значением в функционировании системы окислительного фосфорилирования митохондрий. Действие положительного отбора зарегистрировано только в четырех кодонах генов *ND5* и *CYB* (табл. 3).

При анализе данных только для популяций северо-восточной части Сибири (коряков и эвенков) выявляется еще один кодон, имеющий пограничное значение апостериорной вероятности, равное 0.9, в гене *ND4* (см. табл. 3). В данном случае нуклеотидная замена, приводящая к аминокислотной замене N390S в гене *ND4*, определяет собой филогенетический кластер C5a2, интересный тем, что он распространен преимущественно среди коряков.

Все остальные замены обнаружены в кластерах мтДНК, имеющих более южное распространение, – они ассо-

Таблица 1. Значения Ka/Ks для генов мтДНК у коренного населения Сибири

Ген мтДНК	Коряки (N = 154)	Эвены (N = 219)	Монголоязычные народы (N = 430)
ND1	0.011	0.075	0.109
ND2	0.217	0.188	0.21
CO1	0.008	0.032	0.032
CO2	0.049	0.004	0.042
ATP8	0.018	0.72	0.617
ATP6	1.33	0.71	0.934
CO3	0.00003	0.00003	0.032
ND3	0.548	0.04	0.16
ND4L	0.00001	0.16	0.13
ND4	0.225	0.28	0.12
ND5	0.184	0.075	0.068
CYB	0.4	0.28	0.146

Таблица 2. Значения Ka/Ks для генов мтДНК в региональных группах населения

Ген мтДНК	Сибирь (N = 803)	Западная Азия и Закавказье (N = 753)	Восточная Европа (N = 707)
ND1	0.075	0.31	0.33
ND2	0.203	0.263	0.2
CO1	0.028	0.05	0.025
CO2	0.031	0.042	0.053
ATP8	0.56	0.28	0.71
ATP6	0.932	0.397	0.34
CO3	0.022	0.11	0.19
ND3	0.174	0.31	0.38
ND4L	0.115	0.072	0.045
ND4	0.18	0.025	0.028
ND5	0.092	0.022	0.037
CYB	0.209	0.31	0.47

Таблица 3. Нуклеотидные позиции, находящиеся под действием положительного отбора, в генах мтДНК в региональных группах населения (метод FUBAR)

Ген, кодон, замена	Нуклеотидная позиция, замена	α	β	AB ($\alpha < \beta$)	БФ ($\alpha < \beta$)	Гаплогруппы мтДНК, ассоциированные с заменой
Популяции Сибири						
ND5, T8A	12358, A > G	2.234	14.049	0.915	31.42	N9a, D4j1a
ND5, I257V	13105, A > G	2.375	16.015	0.92	33.31	D4g2a1
ND5, A475T	13759, G > A	2.155	12.928	0.917	32.21	F1a'c'f, H11
CYB, F18L	14798, T > C	2.429	33.074	0.969	89.47	K, J1c
ND4, N390S	11928, A > G	3.058	22.089	0.9	15.04	C5a2
Популяции Западной Азии и Закавказья						
ND2, A331T	5460, G > A	1.379	28.771	0.991	467.9	H1e, J1b1, K1a12, W
CO3, F251L	9957, T > C	1.037	7.623	0.907	42.49	N1b1a3
ND4, L89P	11025, T > C	0.97	16.616	0.959	102.8	K1a2, N1b1, N1a3
ND5, F478L	13768, T > C	1.746	11.402	0.907	42.21	U3b
CYB, T7I	14766, C > T	1.034	7.652	0.93	57.4	HV
Популяции Восточной Европы						
ATP6, I121V	8887, A > G	1.198	7.492	0.902	33.35	W1e, R1
ND4, L89P	11025, T > C	1.139	21.786	0.968	111.1	K1a2, N1a3
ND5, I257V	13105, A > G	2.34	13.831	0.902	33.64	R1a1, U4d2
ND5, T534M	13934, C > T	2.172	15.421	0.923	43.35	J1c3, U3a
CYB, L258P	15519, T > C	1.137	21.875	0.969	112.0	H34

Примечание. α – скорость синонимичных замен; β – скорость несинонимичных замен; AB – апостериорная вероятность; БФ – байесовский фактор. AB для кодонов, находящихся под действием положительного отбора, составила > 0.9.

цируются либо с крупными гаплогруппами мтДНК, распространенными в Восточной и Южной Азии (например, N9a и F1a'c'f) или Западной Евразии (например, H11, K, J1c), либо с относительно небольшими восточноазиатскими гаплогруппами мтДНК, обнаруженными также у бурят, баргутов и хамниган (D4j1a, D4g2a1) (см. табл. 3).

Таким образом, как ни странно, несмотря на ожидаемое действие положительного отбора на отдельные сайты мтДНК в связи с адаптацией коренного населения Северо-Востока Сибири к холодному климату, влияние положительного отбора обнаружено только в более южных сибирских популяциях. К аналогичному выводу

приводят результаты анализа белок-кодирующих генов мтДНК в популяциях Сибири, полученные с помощью других методов – FEL и MEME (результаты не показаны).

Для сравнения проанализированы также наборы данных для популяций Западной Азии/Закавказья и Восточной Европы (см. табл. 3). В первом случае обнаружено, что под действием отрицательного отбора находится 19.5 % (700) кодонов, во втором – 16.4 % (589) кодонов. Под влиянием положительного отбора в обеих региональных группах населения выявлено по пять кодонов (см. табл. 3). Все замены ассоциируются с широко распространенными в Западной Евразии гаплогруппами мтДНК, в связи с чем трудно предположить (по крайней мере, в отсутствие специального анализа), что фиксация этих замен в стволах гаплогрупп произошла в связи с адаптацией популяций к условиям природной среды. Следует отметить, что в двух случаях выявляются свидетельства действия положительного отбора на один и тот же кодон в разных географических регионах: нуклеотидная замена в позиции 11025, определяющая гаплогруппы K1a2 и N1a3 в популяциях Западной Азии/Закавказья и Восточной Европы, и нуклеотидная замена в позиции 13105, определяющая гаплогруппу D4g2a1 у населения Сибири и гаплогруппы R1a1 и U4d2 – у населения Восточной Европы (см. табл. 3).

Закключение

Исследование влияния отбора на митохондриальные гены в различных региональных группах Евразии с помощью стандартного Ka/Ks-анализа показало, что для всех генов мтДНК характерны низкие значения этого параметра ($Ka/Ks < 1$), свидетельствующие о действии отрицательного отбора. Наиболее высокие значения Ka/Ks в различных региональных выборках обнаружены практически в одном и том же наборе генов, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы (*ATP6*, *ATP8*), НАДН-дегидрогеназного комплекса (*ND1*, *ND2*, *ND3*) и цитохром *bc_L*-комплекса (*CYB*). Самое высокое значение Ka/Ks, указывающее на ослабление отрицательного отбора, обнаружено в гене *ATP6* в группе сибирских популяций, причем у коряков формально наблюдается действие положительного отбора на этот ген ($Ka/Ks = 1.33$).

Между тем результаты анализа, направленного на поиск кодонов мтДНК, находящихся под действием отбора, показали многократное преобладание влияния отрицательного отбора над положительным отбором во всех анализируемых группах населения. В сибирских популяциях кодоны, находящиеся под действием положительного отбора и ассоциированные с гаплогруппами мтДНК, зарегистрированы только в популяциях южной части Сибири и прилегающей территории Северо-Восточного Китая (у бурят, баргутов, хамниган). В региональных группах Евразии такого рода кодоны выявляются в различных генах мтДНК (*ND2*, *ND4*, *ND5*, *CO3*, *CYB*), однако в гене *ATP6* обнаружена лишь одна такая позиция (кодон 121) и не в сибирской группе популяций, а в восточноевропейской. По всей видимости, необходимы дальнейшие исследования направленности и силы действия отбора в эволюции мтДНК в различных региональных группах населения Евразии.

Список литературы / References

- Деренко М.В., Малайчук Б.А. Молекулярная филогенетика населения Северной Евразии по данным об изменчивости митохондриальной ДНК. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2010.
[Derenko M.V., Malyarchuk B.A. Molecular Phylogeography of Populations of Northern Eurasia Based on Mitochondrial DNA Variability Data. Magadan: SVNC DVO RAN, 2010. (in Russian)]
- Литвинов А.Н., Малайчук Б.А., Деренко М.В. Характер молекулярной эволюции митохондриальных геномов русского населения Восточной Европы. *Вестн. СВНЦ ДВО РАН*. 2020;2:107-113. DOI 10.34078/1814-0998-2020-2-107-113.
[Litvinov A.N., Malyarchuk B.A., Derenko M.V. The nature of the molecular evolution of the mitochondrial genomes of the Russian population of East Europe. *Vestnik Severo-Vostochnogo Nauchnogo Centra DVO RAN = The Bulletin of the North-East Scientific Center*. 2020;2:107-113. DOI 10.34078/1814-0998-2020-2-107-113. (in Russian)]
- Brown W.M., George M.Jr., Wilson A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(4):1967-1971. DOI 10.1073/pnas.76.4.1967.
- Derenko M., Denisova G., Malyarchuk B., Hovhannisyan A., Khachatryan Z., Hrechdakian P., Litvinov A., Yepiskoposyan L. Insights into matrilineal genetic structure, differentiation and ancestry of Armenians based on complete mitogenome data. *Mol. Genet. Genom.* 2019;294(6):1547-1559. DOI 10.1007/s00438-019-01596-2.
- Elson J.L., Turnbull D.M., Howell N. Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;74(4):229-238. DOI 10.1086/381505.
- Eltsov N.P., Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O., Sukernik R.I. The role of natural selection in the evolution of mitochondrial haplogroups in Northeastern Eurasia. *Rus. J. Genet.* 2010;46(9):1105-1107. DOI 10.1134/S1022795410090243.
- Garcia Ó., Alonso S., Huber N., Bodner M., Parson W. Forensically relevant phylogeographic evaluation of mitogenome variation in the Basque Country. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020;46(5):102260. DOI 10.1016/j.fsigen.2020.102260.
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980;77(11):6715-6719. DOI 10.1073/pnas.77.11.6715.
- Ingman M., Gyllenstein U. Rate variation between mitochondrial domains and adaptive evolution in humans. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(19):2281-2287. DOI 10.1093/hmg/ddm180.
- Kivisild T., Shen P., Wall D.P., Do B., Sung R., Davis K., Passarino G., Underhill P.A., Scharfe C., Torroni A., Scozzari R., Modiano D., Coppa A., de Knijff P., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*. 2006;172(1):373-387. DOI 10.1534/genetics.105.043901.
- Kosakovsky P.S., Frost S.D.W., Muse S.V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*. 2005;21(5):676-679. DOI 10.1093/bioinformatics/bti079.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1451-1452. DOI 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Liu J., Wang L.-D., Sun Y.-B., Li E.-M., Xu L.-Y., Zhang Y.-P., Yao Y.-G., Kong Q.-P. Deciphering the signature of selective constraints on cancerous mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 2012;29(4):1255-1261. DOI 10.1093/molbev/msr290.
- Malyarchuk B.A. Adaptive evolution signals in mitochondrial genes of Europeans. *Biochemistry (Moscow)*. 2011;76(6):702-706. DOI 10.1134/S0006297911060113.
- Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Golik P., Macaulay V., Clark A.G., Hosseini S., Brandon M., Easley K., Chen E., Brown M.D., Sukernik R.I., Olckers A., Wallace D.C. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(1):171-176. DOI 10.1073/pnas.0136972100.

- Murrell B., Moola S., Mabona A., Weighill T., Sheward D., Kosakovsky Pond S.L., Scheffler K. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(5): 1196-1205. DOI 10.1093/molbev/mst030.
- Murrell B., Wertheim J.O., Moola S., Weighill T., Scheffler K., Kosakovsky Pond S.L. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002764. DOI 10.1371/journal.pgen.1002764.
- Olivieri A., Sidore C., Achilli A., Angius A., Posth C., Furtwängler A., Brandini S., Capodiferro M.R., Gandini F., Zoledziewska M., Pitzalis M., Maschio A., Busonero F., Lai L., Skeates R., Gradoli M.G., Beckett J., Marongiu M., Mazzarello V., Marongiu P., Rubino S., Rito T., Macaulay V., Semino O., Pala M., Abecasis G.R., Schlessinger D., Conde-Sousa E., Soares P., Richards M.B., Cucca F., Torroni A. Mitogenome diversity in Sardinians: a genetic window onto an Island's past. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34(5):1230-1239. DOI 10.1093/molbev/msx082.
- Ruiz-Pesini E., Mishmar D., Brandon M., Procaccio V., Wallace D.C. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science.* 2004;303(5655):223-226. DOI 10.1126/science.1088434.
- Skonieczna K., Malyarchuk B., Jawieñ A., Marszałek A., Banaszkiewicz Z., Jarmocik P., Grzybowski T. Mitogenomic differences between the normal and tumor cells of colorectal cancer patients. *Hum. Mutat.* 2018;39(5):691-701. DOI 10.1002/humu.23402.
- Stafford P., Chen-Quin E. The pattern of natural selection in somatic cancer mutations of human mtDNA. *J. Hum. Genet.* 2010;55(9): 605-612. DOI 10.1038/jhg.2010.76.
- Sun C., Kong Q.-P., Zhang Y.-P. The role of climate in human mitochondrial DNA evolution: a reappraisal. *Genomics.* 2007;89(3): 338-342. DOI 10.1016/j.ygeno.2006.11.005.
- Wallace D.C. 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;57(2):201-223. PMID 1801540.

ORCID ID

B.A. Malyarchuk orcid.org/0000-0002-0304-0652
M.V. Derenko orcid.org/0000-0002-1849-784X

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00264 (<https://rscf.ru/project/22-24-00264/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.07.2022. После доработки 14.07.2022. Принята к публикации 14.07.2022.

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

Генетический контроль N-гликозилирования белков плазмы крови человека

С.Ж. Шарапов¹, А.Н. Тимошук¹, Ю.С. Аульченко^{1, 2} 

¹ Институт перспективных исследований проблем искусственного интеллекта и интеллектуальных систем
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 yurii@bionet.nsc.ru

Аннотация. Гликозилирование является важной модификацией белков, которая влияет как на их физико-химические свойства, так и на выполняемые ими биологические функции. Масштабные популяционные исследования показали, что уровни различных N-гликанов белков плазмы крови ассоциированы с риском развития ряда мультифакторных заболеваний человека. Найденные ассоциации стали основанием для рассмотрения N-гликанов в качестве потенциального источника биомаркеров и терапевтических мишеней. Биохимические пути N-гликозилирования хорошо изучены, однако понимание механизмов общей и тканеспецифической регуляции этих биохимических реакций *in vivo* весьма ограничено. Это затрудняет как интерпретацию наблюдаемых ассоциаций уровней N-гликанов с заболеваниями человека, так и разработку биомаркеров и молекулярных мишеней на их основе. Прогресс в области технологий анализа N-гликозилирования белков позволил к началу 2010-х годов проводить исследования регуляции N-гликозилирования с помощью методов генетического анализа, в том числе полногеномного исследования генетических ассоциаций. Применение этих методов дает возможность находить новые, ранее неизвестные регуляторы N-гликозилирования и расширяет представление о роли N-гликанов в контроле мультифакторных заболеваний и комплексных признаков человека. В данном обзоре мы рассматриваем современное состояние исследований генетического контроля популяционной изменчивости уровней N-гликозилирования белков плазмы крови человека. Описаны современные физико-химические методы измерения N-гликомного профиля, приведены базы данных, содержащие гены, вовлеченные в биосинтез N-гликанов. Систематизированы результаты исследований вклада средовых и генетических факторов в популяционную изменчивость N-гликанов, а также результаты картирования геномных локусов N-гликанов методом полногеномного исследования ассоциаций. Представлены результаты последующих функциональных исследований *in vitro* и *in silico*, позволивших предложить новые гены-кандидаты, регулирующие N-гликозилирование белков. В заключение кратко показан текущий прогресс в области гликогеномики человека и описаны возможные пути дальнейших исследований N-гликома.

Ключевые слова: гликом; гликаны; N-гликозилирование; генетика; ПГИА.

Для цитирования: Шарапов С.Ж., Тимошук А.Н., Аульченко Ю.С. Генетический контроль N-гликозилирования белков плазмы крови человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):224-239. DOI 10.18699/VJGB-23-29

Genetic control of N-glycosylation of human blood plasma proteins

S.Zh. Sharapov¹, A.N. Timoshchuk¹, Y.S. Aulchenko^{1, 2} 

¹ MSU Institute for Artificial Intelligence, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 yurii@bionet.nsc.ru

Abstract. Glycosylation is an important protein modification, which influences the physical and chemical properties as well as biological function of these proteins. Large-scale population studies have shown that the levels of various plasma protein N-glycans are associated with many multifactorial human diseases. Observed associations between protein glycosylation levels and human diseases have led to the conclusion that N-glycans can be considered a potential source of biomarkers and therapeutic targets. Although biochemical pathways of glycosylation are well studied, the understanding of the mechanisms underlying general and tissue-specific regulation of these biochemical reactions *in vivo* is limited. This complicates both the interpretation of the observed associations between protein glycosylation levels and human diseases, and the development of glycan-based biomarkers and therapeutics. By the beginning of the 2010s, high-throughput methods of N-glycome profiling had become available, allowing research into the genetic control of N-glycosylation using quantitative genetics methods, including genome-wide association studies (GWAS). Application of these methods has made it possible to find previously unknown regulators of N-glycosylation and expanded the understanding of the role of N-glycans in the control of multifactorial diseases and human complex traits. The present review considers the current knowledge of the genetic control of variability in the levels of N-glycosylation of plasma proteins in human populations. It briefly describes the most popular physical-chemical methods of N-glycome profiling and the databases that contain genes involved in the biosynthesis of N-glycans. It also reviews the results of

studies of environmental and genetic factors contributing to the variability of N-glycans as well as the mapping results of the genomic loci of N-glycans by GWAS. The results of functional *in vitro* and *in silico* studies are described. The review summarizes the current progress in human glycogenomics and suggests possible directions for further research.
Key words: glycome; glycans; N-glycosylation; genetics; GWAS.

For citation: Sharapov S.Zh., Timoshchuk A.N., Aulchenko Y.S. Genetic control of N-glycosylation of human blood plasma proteins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):224-239. DOI 10.18699/VJGB-23-29

Гликомика – раздел гликобиологии

Гликаны – полисахариды или олигосахариды, полимеры, состоящие из моносахаридных звеньев, соединенных гликозидными связями. Гликаны могут ковалентно присоединяться к белкам и липидам путем создания гликозидной связи, образуя гликопротеины и гликолипиды соответственно. Гликозилирование является одной из самых распространенных (Craveur et al., 2014) пост- и ко-трансляционных модификаций белков. Известно, что в природе 20 % всех видов белков гликозилированы (Khougu et al., 2011). При этом более 40 % (по массе) всех белков плазмы крови человека N-гликозилированы (Clerc et al., 2016). Гликозилирование влияет как на физико-химические свойства белков – растворимость, пространственную конфигурацию, фолдинг и т. п. (Varki, 1993; Ohtsubo, Marth, 2006; Skropeta, 2009), так и на их биологическую функцию. Клетки всех без исключения многоклеточных организмов содержат гликоконъюгаты – гликопротеины и гликолипиды с ковалентно присоединенными гликанами (Varki, Kornfeld, 2017).

Гликопротеины и гликолипиды, расположенные на поверхности клеточных мембран, участвуют в процессах клеточных взаимодействий – между клетками, клетками и внеклеточным матриксом и между клетками и макромолекулами, а также в процессах взаимодействий между организмами (хозяин-паразит, симбионт-симбионт и т. п.) (Ohtsubo, Marth, 2006; Skropeta, 2009; Lauc et al., 2016; Poole et al., 2018), тем самым играя огромную роль в развитии и функционировании многоклеточных организмов (Gagneux et al., 2015–2017).

Множество исследований химической структуры гликанов и их метаболизма были проведены в первой половине XX в. Однако в то время гликаны рассматривались в основном как структурные элементы и источники энергии живых систем. Бурное развитие химических, физических и молекулярно-биологических методов исследования гликанов привело к появлению нового раздела молекулярной биологии – гликобиологии. Эта область включает исследования химических и физических свойств гликанов, энзимологии процессов синтеза и деградации гликанов, их эволюции, механизмов распознавания гликанов белками, роли гликанов в функционировании биологических систем и в развитии заболеваний человека, а также разработку методов лечения, профилактики, диагностики и предсказания заболеваний (Varki et al., 2017). В настоящее время гликобиология – быстро развивающаяся наука, имеющая большое значение для многих смежных областей знания, включая биомедицину и биотехнологии (Nikolac Perkovic et al., 2014; Varki, Kornfeld, 2017).

По аналогии с геномикой, транскриптомикой, протеомикой и метаболомикой, гликомика представляет собой

систематическое изучение гликома – совокупности всех гликанов и их концентраций в конкретном образце – клеточной культуре, ткани, органе или целом организме. Разнообразие возможных гликоконъюгатов поражает воображение. Хотя число мономеров, входящих в структуру гликанов, относительно невелико, мономеры могут образовывать различные гликозидные связи, порождая огромное число возможных гликанов. Разнообразие гликоконъюгатов также увеличивается за счет допустимого наличия в белке не одного, а нескольких сайтов гликозилирования.

В начале XXI в. были разработаны высокопроизводительные физико-химические методы, позволившие проводить масштабные когортные исследования ассоциаций N-гликома с заболеваниями и признаками человека. На сегодняшний день показана ассоциация N-гликанов со множеством мультифакторных заболеваний человека (Gudelj et al., 2018a; Dotz, Wuhler, 2019; Reily et al., 2019), включая диабет 2-го типа и моногенные формы диабета (Thanabalasingham et al., 2013; Keser et al., 2017), ревматоидный артрит (Gudelj et al., 2018b), болезнь Паркинсона (Russell et al., 2017), воспалительное заболевание кишечника (Trbojević Akmačić et al., 2015; Clerc et al., 2018), сердечно-сосудистые (Connolly et al., 2016; Wang et al., 2016) и онкологические (Fuster, Esko, 2005; Saldova et al., 2014; Mehta et al., 2015; Taniguchi, Kizuka, 2015) заболевания.

Результаты обсервационных исследований ассоциации гликозилирования белков с заболеваниями не дают ответа на вопрос о причинно-следственных связях между ними и тем более о молекулярно-биологических механизмах, лежащих в основе данных связей. С 1983 г. проводятся исследования функциональных последствий изменений в гликозилировании белков (Anthony et al., 2012; Cobb, 2020). Гликозилирование иммуноглобулинов класса G (IgG) является наиболее изученным с этой точки зрения ввиду важности данного гликопротеина в адаптивном иммунитете. Молекула IgG имеет консервативный сайт гликозилирования Asn297, находящийся в консервативном домене СН2 тяжелой цепи. Этот домен играет важную роль в связывании с Fcγ-рецепторами, что в свою очередь влияет на эффекторную функцию IgG. Показано, что снижение уровня фукозилирования IgG усиливает антителозависимую клеточную цитотоксичность (Peirp et al., 2008). Дальнейшие исследования с использованием методов кристаллографии показали, что отсутствие фукозилирования IgG вызывает увеличение аффинности между Fc доменом IgG и рецептором FcγRIIIA, а наличие фукозы в составе гликана IgG ведет к появлению стерических затруднений при взаимодействии (Mizushima et al., 2011).

Изучение процессов гликозилирования является фундаментально важным для решения задач диагностики, пред-

сказания, профилактики и лечения заболеваний человека. В 2012 г. Национальная академия наук США представила доклад о необходимости полномасштабного изучения гликома, так как гликаны напрямую вовлечены в патогенез практически всех известных заболеваний (http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=13446).

Строение и разнообразие гликанов

Углеводы – одна из основных групп макромолекул, выделяемых в биологии наряду с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами. Благодаря способности к полимеризации и наличию высокого числа хиральных атомов моносахариды могут формировать огромное количество различных стерео- и региоизомеров. По степени полимеризации различают четыре основные группы углеводов: моносахариды (глюкоза, фруктоза, галактоза, т. д.); дисахариды (молекулы, состоящие из двух моносахаридов, связанных гликозидной связью, например, сахароза, лактоза, мальтоза); полисахариды с повторяющимися звеньями, образующие как линейные, так и разветвленные соединения (О-антигены бактерий, амилоза, целлюлоза, хитин), и гликаны – сложные олигосахариды с неповторяющимися звеньями, свободные или связанные с белками или липидами (гликопротеины, протеоглики и гликолипиды).

В свою очередь, гликаны, связанные с белками, подразделяются на N-, O- и C-гликаны. N-гликаны создают гликозидную связь с атомом азота (N), находящимся в составе аминокислоты аспарагина; O-гликаны – гликозидную связь с гидроксильной группой аминокислот серина или треонина; C-гликаны – гликозидную связь с атомом углерода, входящим в состав аминокислоты триптофана. C-гли-

козилирование встречается редко по сравнению с N- и O-гликозилированием (Chauhan et al., 2013).

Важным отличием N-гликозилирования от O-гликозилирования является то, что N-гликозидная связь образуется только с аспарагином, входящим в состав мотива Asn-X-Ser/Thr, где в качестве «X» может выступать любая аминокислота, за исключением пролина, в то время как для O-гликанов такого мотива не известно. Более того, существует фермент PNGase F, специфично расщепляющий N-гликозидную связь между гликаном и белком, в результате чего N-гликаны высвобождаются в раствор для дальнейшего анализа (Vilaj et al., 2021). В отличие от N-гликозилирования, сайт O-гликозилирования не имеет консенсусной последовательности, и существующие методы выделения O-гликанов (бета-элиминирование) обладают меньшей специфичностью по сравнению с таковой для N-гликанов (Mulloy et al., 2017). Отчасти поэтому на сегодняшний день наиболее хорошо разработаны технологии и протоколы определения структуры и высокопроизводительного анализа уровней N-гликанов, которым и посвящен настоящий обзор.

Наиболее распространенные мономеры в составе N-гликанов – моносахариды манноза, фукоза, галактоза, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и сиаловая кислота (рис. 1). В структуре N-гликанов всегда присутствует остов (Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr), к которому с помощью гликозидных связей присоединяются остальные мономеры. Структура гликанов может быть разветвленной и включать в себя одну или несколько ветвей – антенн. К каждой из антенн могут присоединяться мономеры – галактоза, сиаловая кислота или фукоза. Фукоза также может присоединять-

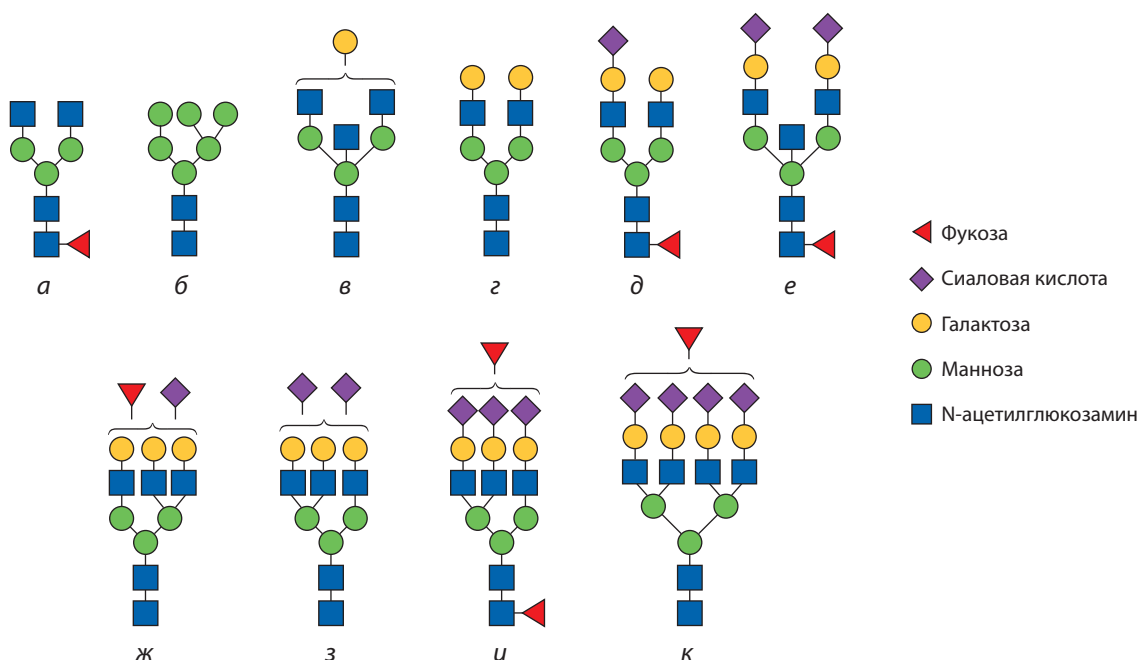


Рис. 1. Примеры структур N-гликанов: б – гликан с большим числом остатков маннозы, остальные гликаны имеют комплексную структуру; а, в, г – биантеннарные гликаны; ж–и – триантеннарные гликаны; к – тетраантеннарный гликан.

У структур а, д, е и и присутствует фукозилирование остова N-гликана; структуры ж, и и к антеннарно фукозилированы (фукоза присоединена к антенне). В структурах в и е присутствует бисектный (bisecting) остаток N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). В структурах в–к и д–к присутствуют остатки галактозы и сиаловой кислоты соответственно.

ся непосредственно к остову. Отрицательно заряженная сиаловая кислота – единственный мономер в составе N-гликанов, который несет заряд. Гликаны, не несущие в своем составе сиаловой кислоты, являются нейтральными. В составе N-гликана сиаловая кислота всегда связана с остатком галактозы.

Одна из наиболее популярных в настоящее время так называемая оксфордская номенклатура гликанов (Harvey et al., 2009) следует правилам:

1. Символ “F” в самом начале обозначения говорит о наличии фукозы, присоединенной к остову.
2. Далее идет последовательность AN, где N – число антенн (ветвей) в структуре гликана.
3. Затем, в случае наличия рассечения сахарного остова, добавляется символ “B” (bisecting).
4. Далее, в случае фукозилирования антеннарных ветвей, добавляется символ “F”.
5. Если в структуре гликана присутствует галактоза, присоединенная к одной или нескольким антеннам, то далее идет последовательность G[n1,n2,...]N, где N – число галактоз в составе гликана, а n1 – атом углерода в составе галактозы, с которым образована гликозидная связь.
6. Если в структуре гликана присутствует сиаловая кислота, присоединенная к одной или нескольким антеннам, то далее идет последовательность S[n1,n2,...]N, где N – число остатков сиаловой кислоты в составе гликана, а n1 – атом углерода в составе сиаловой кислоты, с которым образована гликозидная связь.

Например, “FA2” обозначает, что в структуре гликана присутствуют остаток фукозы, присоединенный к остову, а также две антенны. “A3BG3S1” говорит о том, что в структуре гликана имеются три антенны, рассечение сахарного остова, галактозилирование трех антенн и сиалирование одной антенны.

Гены, вовлеченные в биологические пути N-гликозилирования

В отличие от мРНК и белков, закодированных в последовательности геномной ДНК и синтезирующихся в результате матричных процессов, структура гликанов не закодирована в геноме напрямую. Биосинтез гликанов представляет собой разветвленную сеть биохимических реакций (Lombard et al., 2014). Конечная структура гликана определяется взаимодействием множества молекул и факторов – субстратов и их доступностью, активностью ферментов биосинтеза и деградации гликанов, их локализацией и конкуренцией за субстрат, и белками-транспортерами (Kukuruzinska, Lennon, 1998; Nairn et al., 2008, 2012; Moremen et al., 2012). Показано также, что структура и разнообразие N-гликанов, присутствующих в определенных клетках или тканях, отчасти регулируются на уровне транскрипции генов, кодирующих белки, которые участвуют в синтезе и деградации гликанов (Nairn et al., 2008, 2012; Moremen et al., 2012).

Биосинтез гликанов происходит в эндоплазматическом ретикулеуме и аппарате Гольджи. На сегодняшний день в базе данных KEGG содержится информация о более чем 300 ферментах, участвующих в процессах синтеза и деградации гликанов (Kanehisa et al., 2017). Одними из основных ферментов, непосредственно участвующих

в биосинтезе N-гликанов, являются гликозилтрансферазы – ферменты, которые переносят активированные моносахариды к растущему гликану. В специализированной базе данных CAZy (Lombard et al., 2014) содержатся аннотация и классификация более 200 гликозилтрансфераз, по крайней мере 40 из которых относятся к пути N-гликозилирования белков. Кроме того, К.С. Егорова с коллегами разработали базу данных CSDB_GT, содержащую экспериментально подтвержденные активности CAZy (Egorova et al., 2021). Этапы биосинтеза N-гликанов и соответствующие гены гликозилтрансфераз подробно описаны в обзорах (Saito, Ishii, 2002; Mohanty et al., 2020).

Физико-химические методы высокопроизводительного секвенирования N-гликанов

Бурное развитие гликобиологии в совокупности с огромным успехом популяционных эпидемиологических исследований ускорило разработку методов высокопроизводительного измерения гликома белков плазмы крови. За последние десять лет создано несколько методов высокопроизводительного профилирования N-гликома (Huffman et al., 2014): высокоэффективная и сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ и СВЭЖХ, high and ultra-high performance liquid chromatography, HPLC и UHPLC), мультиплексный капиллярный гель-электрофорез с флуоресцентной детекцией (multiplex capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence detection, xCGE-LIF), жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия (liquid chromatography electrospray mass spectrometry, LC-MS), матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация и tandemная масс-спектрометрия (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS). Представительные профили N-гликозилирования белков плазмы крови человека, измеренные тремя различными методами, представлены на рис. 2.

В обзорной статье (de Naan et al., 2022) проведено подробное сравнение пяти наиболее популярных методов измерения N-гликома белков плазмы крови человека. Несмотря на разнообразие технологий, которые используются в данных методах, все они состоят из нескольких ключевых этапов – подготовки образца (клеточной культуры, ткани, органа или организма), выделения N-гликанов (например, путем отщепления от гликоконъюгатов), разделения N-гликанов и измерения их концентрации (абсолютной или относительной) (Huffman et al., 2014).

Применение того или иного метода для анализа гликанов имеет свои достоинства и недостатки. Методами UHPLC и xCGE-LIF анализируют гликаны, отщепленные от белка, в то время как методами MALDI-TOF-MS и LC-MS, основанными на масс-спектрометрии, можно анализировать конкретные гликопептиды, в состав которых входит участок белка с ковалентно соединенным гликаном. По сравнению с методами СВЭЖХ и xCGE-LIF, методы MALDI-TOF-MS и LC-MS идентифицируют гликаны различной молекулярной массы, но не могут разделять стереоизомеры гликанов. Методы СВЭЖХ и xCGE-LIF обладают достаточно хорошей разрешающей способностью и позволяют получать более точные количественные

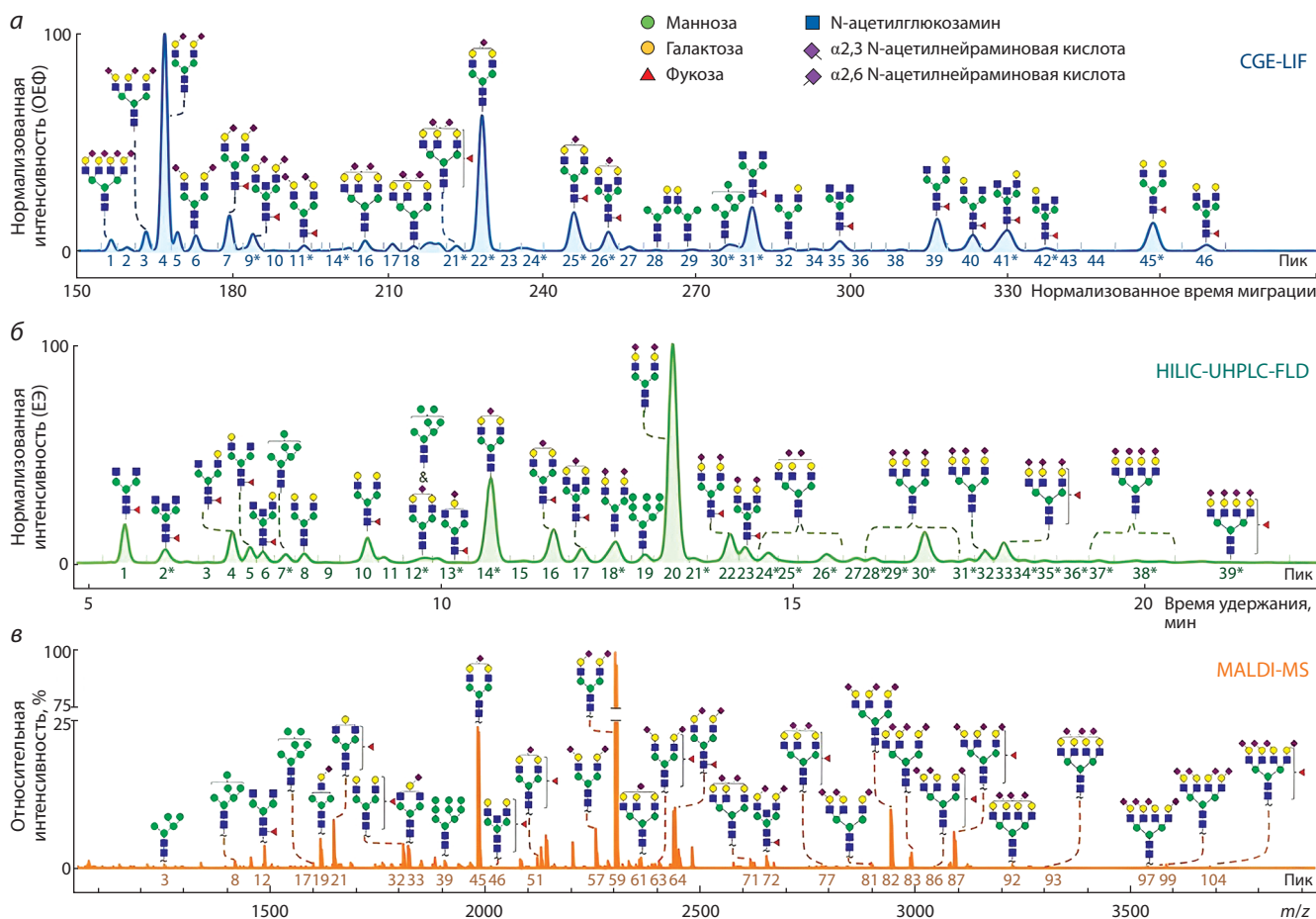


Рис. 2. Профили N-гликозилирования белков плазмы крови, полученные с применением методов СВЭЖХ, xCGE-LIF и MALDI-MS.

N-гликомные профили, полученные методами: а – xCGE-LIF (Reiding et al., 2019); б – СВЭЖХ (Reiding et al., 2019; Zaytseva et al., 2020); в – MALDI-MS после дифференциальной этерификации сиаловой кислоты (Vreeker et al., 2018; Reiding et al., 2019; Zaytseva et al., 2020). Рисунок адаптирован из статьи (de Haan et al., 2022).

оценки. Данные методы имеют высокую производительность и меньшую начальную себестоимость по сравнению с методами, основанными на масс-спектрометрии.

Среди перечисленных методов высокопроизводительного измерения N-гликома белков плазмы крови наибольшее распространение получил метод СВЭЖХ (Акта́си́с et al., 2015) благодаря его относительной дешевизне, улучшенному разрешению (по сравнению с ВЭЖХ) и высокой производительности. На октябрь 2022 г. в мировом масштабе исследован гликом плазмы крови человека примерно 200000 образцов. Из этого объема около 80 % изучено с применением технологии СВЭЖХ (Г. Лауц, личное сообщение).

Наследуемость уровней N-гликозилирования белков плазмы крови человека

Развитие методов высокопроизводительного измерения гликома и генетического анализа позволило к началу 2010-х гг. провести первые исследования генетического контроля гликозилирования на материале когортных исследований. N-гликом плазмы крови стал основным объектом исследования по ряду причин: во-первых, по сравнению с другими тканями человека плазма крови – более

доступный объект исследования; во-вторых, как было сказано ранее, на сегодняшний день наиболее хорошо разработаны технологии определения структуры и измерения уровней N-гликанов. Самыми представленными гликопротеинами плазмы крови человека являются иммуноглобулины G, A, M, фибриноген, трансферрин, гаптоглобин и др. (Clerc et al., 2016). Главным источником гликопротеинов плазмы крови человека служат клетки печени и клетки, продуцирующие антитела (Uhlén et al., 2015; Clerc et al., 2016).

В работе (Knezević et al., 2009) изучены популяционная изменчивость гликанов плазмы крови человека, их наследуемость (доля дисперсии признака, обусловленная генетическими различиями), а также влияние различных факторов среды на уровень гликанов. В данной работе уровни гликанов измеряли с использованием технологии ВЭЖХ. Авторы сделали несколько важных выводов. Во-первых, была установлена высокая популяционная изменчивость уровней гликозилирования. Во-вторых, обнаружен достоверный эффект пола и возраста человека на уровень различных гликанов, что говорит о важности учета данных параметров. В-третьих, наследуемость уровней гликанов варьировалась (средний коэффициент наследо-

вания $h^2 = 34.7\%$, стандартное отклонение – 15.5%), что говорит о том, что гликаны находятся под контролем как генетических, так и средовых факторов.

В работе (Zaytseva et al., 2020) исследователи оценили наследуемость 39 N-гликаных признаков, измеренных технологией СВЭЖХ. Показано, что для 24 из 39 признаков наследуемость составляет более 50% (средний коэффициент наследования $h^2 = 48.0\%$, стандартное отклонение – 17.7%), что подтверждает гипотезу о существенном влиянии на гликом плазмы крови как средовых, так и генетических факторов. Авторы отметили самую высокую наследуемость ($> 50\%$) у биантеннарных гликанов с фукозилированием остова и пониженным уровнем сиалирования антеннарных цепей, находящихся в составе иммуноглобулинов, преимущественно IgG, который является самым представленным гликопротеином среди всех белков плазмы крови человека (Clerc et al., 2016; Uhlén et al., 2019). Среднюю и высокую наследуемость ($30\text{--}62\%$) показали би- и триантеннарные гликаны с высоким уровнем сиалирования антеннарных цепей. О.О. Zaytseva с коллегами (2020) полагают, что в этом случае высокая наследуемость может объясняться как наличием данных структур в составе большого числа гликопротеинов (трансферрин, гемопексин, альфа-1-анти-трипсин, альфа-1-кислый гликопротеин), что приводит к погрешностям в оценивании генетических факторов для каждого из них по отдельности, так и нахождением этих гликанов в составе преимущественно гликопротеинов, продуцируемых клетками печени, гликозилирование которых подвержено значительному влиянию окружающей среды ввиду принадлежности к белкам острой фазы воспаления (Jain et al., 2011).

Несмотря на то что изучение наследуемости дает возможность оценить, какая доля изменчивости признака находится под контролем генома, такие исследования не позволяют найти конкретные участки генома, влияющие на проявление признака. Поиск таких участков возможен с применением методов картирования генов количественных признаков, в частности метода полногеномного анализа ассоциаций.

Полногеномные исследования ассоциаций уровней N-гликанов, связанных с белками плазмы крови

Самый широко используемый метод картирования локусов комплексных признаков и заболеваний человека – полногеномное исследование ассоциации (ПГИА). Этот метод предполагает проведение анализа ассоциаций между большим числом (от сотен тысяч до десятков миллионов) генетических маркеров, распределенных по всему геному, и исследуемым признаком. При этом, как правило, анализируются большие (от нескольких тысяч до миллионов) выборки особей или индивидов. Наличие таких данных позволяет тестировать практически весь геном на присутствие ассоциаций с исследуемым признаком и, таким образом, найти новые, ранее неизвестные ассоциации между локусами и признаками. Чаще всего в ПГИА используется материал не одной, а нескольких выборок. Результаты исследования каждой из выборок объединяются с применением методов полногеномного

метаанализа (Winkler et al., 2014), что увеличивает общий размер выборки и тем самым повышает статистическую мощность анализа ассоциаций.

Наличие ассоциации геномного локуса с изучаемым признаком не дает ответа на вопрос о молекулярно-биологических механизмах, лежащих в основе полученной ассоциации. В выявленных локусах могут располагаться от одного до десятков генов либо генов в локусе может не быть вообще (рис. 3) (Visscher et al., 2012, 2017). При этом существует множество причин возникновения ассоциации: наличие в локусе кодирующих замен, влияющих на структуру и функционирование продукта гена (белка или РНК); замен, влияющих на специфичность связывания транскрипционных факторов с регуляторными областями. Само число функциональных вариантов может варьироваться от одного до многих (Yang et al., 2012).

Определение функциональных генов в найденных локусах и механизмов их влияния на исследуемый признак – важная задача функциональных исследований, проводимых с применением методов молекулярной и клеточной биологии. При этом число возможных гипотез, требующих тестирования, растет (теоретически) в геометрической прогрессии в зависимости от числа возможных молекулярных механизмов ассоциации. Принимая во внимание сложность, дороговизну и трудоемкость методов молекулярной и клеточной биологии, крайне важным является проведение первичной биоинформатической приоритизации гипотез о механизмах возникновения ассоциации. К настоящему времени разработано большое число методов функциональной аннотации *in silico* (Yang et al., 2012; Bulik-Sullivan et al., 2015; Pers et al., 2015; McLaren et al., 2016; Staley et al., 2016; Zhu et al., 2016; Pasaniuc, Price, 2017; Hemani et al., 2018). Применение данных методов позволяет приоритизировать гипотезы о механизме ассоциации, тем самым повышая эффективность дальнейших молекулярно-биологических исследований.

К настоящему времени в качестве объектов для исследования генетического контроля гликозилирования белков методом ПГИА использованы: общий N-гликом белков плазмы крови человека (чему посвящен наш обзор) (Lauc et al., 2010a, b; Huffman et al., 2011; Sharapov et al., 2019, 2020), N-гликом иммуноглобулина G – наиболее представленного N-гликопротеина плазмы крови (Lauc et al., 2013; Shen et al., 2017; Wahl et al., 2018; Klarić et al., 2020; Shadrina et al., 2021), а также N-гликом трансферрина (Landini et al., 2022), секретируемого печенью.

На сегодняшний день опубликованы результаты пяти ПГИА общего N-гликома белков плазмы крови человека (Lauc et al., 2010a, b; Huffman et al., 2011; Sharapov et al., 2019, 2020).

ПГИА общего N-гликома белков плазмы крови человека

Первые ПГИА уровней N-гликозилирования белков человека проведены в 2010–2011 гг. (Lauc et al., 2010a, b; Huffman et al., 2011). В этих работах для анализа уровней гликозилирования использованы метод ВЭЖХ и генетические данные с невысокой (по сегодняшним меркам) плотностью покрытия генома маркерами – до 2.5 млн ОНП на геном. В ПГИА 2010–2011 гг. было найдено шесть ло-

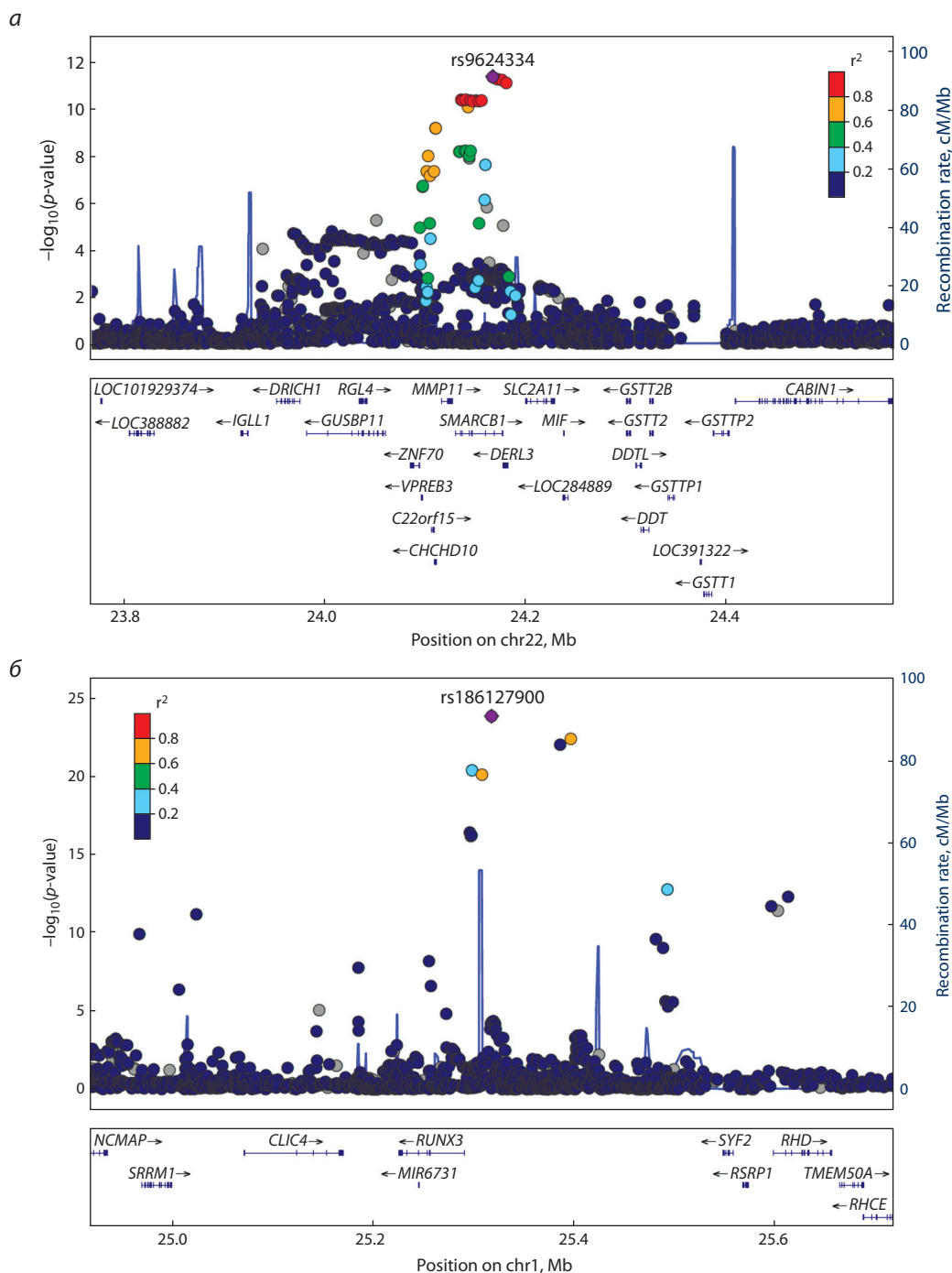


Рис. 3. Примеры графиков региональной ассоциации, визуализирующих ассоциацию между признаком и генетическими маркерами, расположенными в локусе.

По оси ординат отложен отрицательный десятичный p -value генетической ассоциации, по оси абсцисс – геномные координаты генетического маркера (ОНП). Сигнал ассоциации может быть расположен в кодирующей части нескольких генов (а), может не включать гены (б).

кусов (*FUT8*, *HNFI1A*, *FUT3/FUT5/FUT6*, *MGAT5*, *B3GAT1*, *SLC9A9*), ассоциированных с N-гликозилированием белков плазмы крови человека. Отметим, что ни в одном из этих исследований не использованы независимые образцы для подтверждения результатов.

В исследовании, опубликованном в 2019 г. (Sharapov et al., 2019), были взяты данные выборки британского

близнецового исследования – TwinsUK Registry (Spector, Williams, 2006; Moayyeri et al., 2013). Для 2763 участников исследования были доступны данные полногеномного генотипирования и первичные данные СВЭЖХ N-гликома белков плазмы крови. Число ОНП было увеличено с 2.5 до 8.5 млн в результате проведенной импутации с использованием данных проекта «1000 геномов» и со-

Локусы, ассоциация которых (за исключением *KREMEN1*) подтверждена на независимых выборках в исследовании (Sharapov et al., 2020)

ОНП	Позиция	Ген	ЭФФ/РЕФ	EAF	Признак	BETA	SE	<i>p</i>	<i>N</i>
rs186127900	1:25318225	<i>RUNX3</i>	G/T	0.99	FA2G2S2	1.24	0.19	1.16E–10	1245
rs1257220	2:135015347	<i>MGAT5</i>	A/G	0.26	G4total, A4total	0.22	0.02	6.11E–20	4343
rs4839604	3:142960273	<i>SLC9A9</i>	C/T	0.80	FBS2/FS2	–0.20	0.03	3.87E–11	3592
rs17775791	3:186722362	<i>ST6GAL1</i>	C/T	0.26	FG1S1/(FG1+FG1S1)	–0.49	0.02	8.60E–97	4343
rs3115663	6:31601843	<i>PRRC2A</i>	C/T	0.18	M9	–0.15	0.03	1.63E–07	4343
rs6421315	7:50355207	<i>IKZF1</i>	C/G	0.37	A2[6]BG1n	–0.23	0.02	1.19E–27	4802
rs13297246	9:33128617	<i>B4GALT1</i>	A/G	0.17	FA2G2n	0.31	0.03	1.28E–24	4051
rs3967200	11:126232385	<i>ST3GAL4</i>	C/T	0.86	G4S3/G4S4	0.63	0.03	1.20E–106	4802
rs7928758	11:134265967	<i>B3GAT1</i>	G/T	0.15	A4G4S3	–0.36	0.03	6.43E–27	3592
rs735396	12:121438844	<i>HNF1A</i>	C/T	0.35	G3Fa/G3total	–0.21	0.02	4.91E–20	4343
rs11621121	14:65822493	<i>FUT8</i>	C/T	0.42	FG3/G3total	–0.31	0.02	8.94E–45	4187
rs35590487	14:105989599	<i>IGH, TMEM121</i>	C/T	0.75	FA2[3]G1n	–0.20	0.03	1.38E–09	2469
rs3760776	19:5839746	<i>FUT6</i>	A/G	0.09	G3Fa/G3total	–0.48	0.05	3.85E–23	2469
rs9624334	22:24166256	<i>SMARCB1, DERL3, CHCHD10</i>	C/G	0.17	FA2[6]BG1n	–0.31	0.03	7.15E–26	4051
rs909674	22:39859169	<i>MGAT3</i>	A/C	0.70	FBn	–0.22	0.02	1.88E–20	4343
rs140053014	22:29550678	<i>KREMEN1</i>	Ins/Del	0.98	FA2[3]G1n	–0.68	0.23	0.0027	459

Примечание. ОНП – ОНП, показавший наименьшее *p*-value; ЭФФ/РЕФ – эффекторный, референсный аллель; EAF – частота эффекторного аллеля; BETA – оценка эффекта эффекторного аллеля на признак; SE – его стандартная ошибка; *p* – *p*-value ассоциации ОНП с признаком.

ответствующего контроля качества. Была подтверждена ассоциация 5 из 6 локусов, найденных ранее (всех за исключением *SLC9A9*), а также выявлено 10 новых локусов.

По результатам четырех исследований (Lauc et al., 2010a, b; Huffman et al., 2011; Sharapov et al., 2019) в общей сложности найдены ассоциации с 16 локусами, 15 из них были в дальнейшем подтверждены в работе (Sharapov et al., 2020) (см. таблицу), в которой использована крупнейшая (на момент проводимого исследования) коллекция геномных и гликомных данных для 4802 образцов из четырех выборок – EPIC-Potsdam, PainOmics, SOCCS и SABRE, детальное описание которых представлено в дополнительных примечаниях к статье (Sharapov et al., 2020). Участники данных исследований были генотипированы с использованием следующих ДНК чипов: EPIC-Potsdam (Human660W, 560 000 ОНП, HumanCoreExome, 410 000 ОНП, InfiniumOmniExpressExome, 850 000 ОНП), PainOmics (Illumina HumanCore BeadChip, 720 000 ОНП, Illumina GSA, 300 000 ОНП), SOCCS (HumanHap300/ HumanHap240S, 510 000 ОНП), SABRE (Illumina Human Core Bead Chip, 330 000 ОНП).

Когортное исследование EPIC-Potsdam включает 27 000 участников в возрастном диапазоне 35–65 лет. Участники были набраны случайным образом из популяции в г. Потсдам (Германия), в период с 1994 по 1998 г. (Boeing et al., 1999). PainOmics (Allegri et al., 2016) – исследование типа «случай-контроль», направленное на поиск потенциальных биомаркеров дисплазии и терапевтических мишеней для его лечения. В период с 2014 по 2016 г. была собрана выборка из 3400 участников, проживающих в Италии, Бельгии, Англии и Хорватии.

Шотландское исследование SOCCS (Theodoratou et al., 2016; Vučković et al., 2016) является исследованием «случай-контроль», направленным на изучение факторов риска колоректального рака. Были собраны данные о 2000 пациентах с колоректальным раком и 2100 контрольных испытуемых. SABRE – это популяционное исследование, начатое в 1988 г. (Tillin et al., 2012). Всего были собраны данные о 4800 участниках в возрасте от 40 до 69 лет, проживающих в Западном Лондоне (Великобритания).

Для приоритизации новых генов-регуляторов гликозилирования белков в подтвержденных локусах и для выдвижения гипотез о потенциальных механизмах действия этих локусов в работе (Sharapov et al., 2019) был применен ансамбль методов количественной генетики и биоинформатики. Эти методы и подходы описаны ниже.

1. Приоритизация генов на основании результатов анализов колокализации с eQTL. Методы колокализации, в частности использованный авторами метод SMR/HEIDI (Zhu et al., 2016), позволяют идентифицировать гены, изменение экспрессии (на уровне мРНК) которых опосредует ассоциацию между ОНП и изучаемым признаком.
2. Приоритизация генов, основанная на определении возможных функциональных последствий нуклеотидных замен, находящихся в высоком неравновесии по сцеплению с ОНП, ассоциированными с N-гликомными признаками. С помощью методов VEP (McLaren et al., 2016), FATHMM-XF (Rogers et al., 2018), FATHMM-InDel (Ferlaine et al., 2017) выбирались ОНП, замены в которых изменяли первичную аминокислотную последовательность белка и/или классифицировались как

патогенные. Гены, последовательность которых была затронута такими заменами, приоритизировались как гены-кандидаты.

3. Приоритизация генов на основании их вовлеченности в различные биологические пути. Метод DEPICT (Pers et al., 2015) приоритизирует гены и биологические пути на базе результатов анализа обогащения (перепредставленности генов того или иного биологического пути в ассоциированных локусах), который в свою очередь проводится на основе заранее рассчитанной вероятности принадлежности того или иного локуса к конкретной генной сети и/или биологическому пути.

Если для того или иного локуса применение описанных выше методов не привело к приоритизации какого-то гена, выбирали ген, ближайший к ОНП с самой достоверной ассоциацией в локусе.

Гены-кандидаты, вовлеченные в процессы N-гликозилирования белков плазмы крови

В результате проведенных *in silico* анализов в работе по изучению общего N-гликома плазмы крови (Sharapov et al., 2019) для 15 локусов были приоритизированы 20 генов-кандидатов (рис. 4).

В этом разделе приведено подробное описание этих генов и гипотезы об их возможной роли в регуляции N-гликозилирования белков плазмы крови человека.

В 8 из 15 локусов (*MGAT5*, *MGAT3*, *FUT3/FUT5/FUT6*, *FUT8*, *ST6GAL1*, *ST3GAL4*, *B4GALT1*, *B3GAT1*) в качестве генов-кандидатов содержатся гены, кодирующие ферменты – гликозилтрансферазы, участвующие в биосинтезе N-гликанов.

В локусе на 2-й хромосоме, 125 м. п. н., геном-кандидатом является *MGAT5*, кодирующий фермент GnT-V – альфа-1,6-маннозилгликопротеин 6-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу. Данный фермент переносит остаток N-ацетилглюкозамина к маннозе в составе N-гликана, при этом образуется три- или тетраантенный N-гликан. Локус с геном *MGAT5* показал ассоциацию с гликомными признаками, отражающими уровень три- и тетраантенных гликанов (Sharapov et al., 2019).

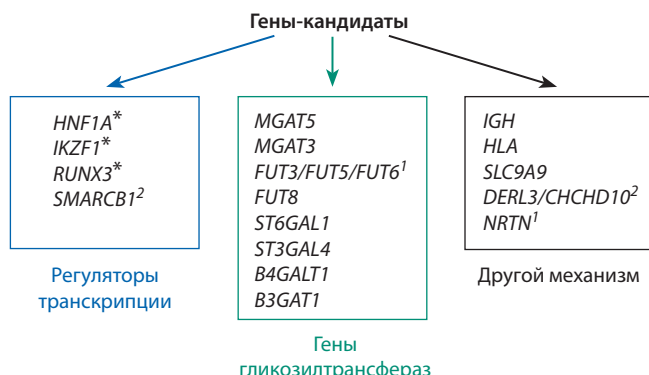


Рис. 4. Предложенные в работе (Sharapov et al., 2019) гены-кандидаты, регулирующие уровни гликозилирования белков плазмы крови человека.

Звездочкой отмечены гены, роль которых в регуляции гликозилирования доказана в результате экспериментов. Верхний индекс обозначает приоритизацию генов-кандидатов внутри одного локуса.

В локусе на 22-й хромосоме, 39 м. п. н., ген-кандидат – *MGAT3*, кодирующий N-ацетилглюкозаминилтрансферазу GnT-III – бета-1,4-маннозилгликопротеин 4-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу. Этот фермент переносит остаток N-ацетилглюкозамина к маннозе в составе N-гликана в определенную позицию, при этом образуется расщепление остова. Показано наличие плейотропного эффекта данного локуса как на уровни N-гликанов, так и на уровень экспрессии гена *MGAT3* в CD19+ клетках (B-лимфоцитах) (Sharapov et al., 2019; Klarić et al., 2020).

В локусе на 14-й хромосоме, 66 м. п. н., ген-кандидат – *FUT8*. Этот ген кодирует фермент Fuc-TVIII – альфа-(1, 6)-фукозилтрансферазу. Данный фермент переносит остаток фукозы к N-ацетилглюкозамину, находящемуся в остова N-гликана, и тем самым отвечает за фукозилирование остова N-гликанов. Следует отметить, что локусы *FUT8* и *MGAT3* показали ассоциацию с признаками FBS2/(FS2+FBS2) и FBS2/FS2, отражающими представленность расщепления остова у биантенных гликанов с фукозилированием остова (Sharapov et al., 2019), что подтверждает известный факт интерференции активностей ферментов Fuc-TVIII и GnT-III (Brockhausen, Schachter, 1997).

В локусе на 19-й хромосоме, 5,8 м. п. н., генами-кандидатами являются *FUT6*, *FUT5*, *FUT3*, *NRTN*. Ген *NRTN* кодирует нейротропический фактор, регулирующий выживание и функционирование нейронов. Гены *FUT6* и *FUT3/FUT5* кодируют ферменты Fuc-TVI и Fuc-TIII – фукозилтрансферазы 6 и 3 соответственно, переносящие остаток фукозы с ГДФ-фукозы к N-ацетилглюкозамину путем образования альфа-1,3(4)-гликозидной связи. Эти ферменты ответственны за антеннарное фукозилирование N-гликанов. В работе (Sharapov et al., 2019) продемонстрировано, что этот локус ассоциирован с антеннарным фукозилированием три- и тетраантенных гликанов. Нужно отметить, что в гене *FUT6* расположен ОНП rs17855739. Этот ОНП кодирует замену G>A (частота аллеля A ~12 % в популяциях человека, согласно базе данных TopMED), которая приводит к замещению отрицательно заряженной глутаминовой кислоты на положительно заряженный лизин в 247-й позиции (замена p.Glu247Lys). Эта замена расположена в каталитическом домене фермента Fuc-TVI и приводит к инактивации фермента. Таким образом, этот вариант может иметь функциональное влияние на гликозилирование белков плазмы крови человека. Нужно отметить, что гены *FUT3*, *FUT5* и *FUT6* произошли от общего предкового гена в результате двух дупликаций (Duruu et al., 2002). При этом экспрессия гена *FUT5* на уровне транскрипции и трансляции в организме человека гораздо слабее по сравнению с *FUT3* и *FUT6* (Taniguchi et al., 2014).

В локусе на 3-й хромосоме, 186 м. п. н., ген-кандидат – *ST6GAL1*. Ген *ST6GAL1* кодирует альфа-2,6-сиалилтрансферазу 1. Этот фермент катализирует образование альфа-2,6-гликозидной связи между сиаловой кислотой и N-ацетилглюкозаминном, связанным с галактозой, в составе N-гликана. В работе (Sharapov et al., 2019) локус *ST6GAL1* ассоциирован с уровнями моно- и дисиалилированных N-гликанов и их предшественников.

В локусе на 11-й хромосоме, 126 м.п.н., геном-кандидатом является *ST3GAL4*. Ген *ST3GAL4* кодирует фермент альфа-2,3-сиалилтрансферазу, переносящую остаток сиаловой кислоты. Данный локус показал ассоциацию с уровнями различных сиалилированных N-гликанов (Sharapov et al., 2019).

В локусе на 9-й хромосоме, 33 м.п.н., ген-кандидат – *B4GALT1*. Ген *B4GALT1* кодирует фермент галактозилтрансферазу, присоединяющий галактозу к различным субстратам, в том числе и к N-ацетилглюкозамину. Локус *B4GALT1* был ассоциирован с уровнями галактозилированных биантеннарных N-гликанов и их предшественников (Sharapov et al., 2019). Известно, что ряд мутаций в гене *B4GALT1* приводит к врожденному заболеванию гликозилирования (Staretz-Chacham et al., 2020).

В локусе на 11-й хромосоме, 134 м.п.н., геном-кандидатом является *B3GAT1*, кодирующий фермент галактозилгалактозилксилозилпротеин-3-бета-глюкуронозилтрансферазу 1-го типа. Этот фермент катализирует перенос глюкуроновой кислоты в ходе биосинтеза HNK-1 эпитопа. Этот эпитоп экспрессируется на лимфоцитах, однако его присутствие на белках плазмы крови до определенного момента не было известно. Ассоциация данного локуса с уровнями N-гликанов белков плазмы крови впервые приведена в работе (Huffman et al., 2011). В исследовании (Sharapov et al., 2019) обнаружено присутствие глюкуроновой кислоты в N-гликоме плазмы крови, что может объяснять ассоциацию этого локуса.

В семи других локусах гены-кандидаты не были генами гликозилтрансфераз. В локусе на 22-й хромосоме, 39 м.п.н., были приоритизированы три гена – *SMARCB1*, *DERL3*, *CHCHD10*. В кодирующей последовательности гена *SMARCB1* расположен самый сильный сигнал ассоциации в этом локусе. Ген *SMARCB1* кодирует белок – часть комплекса hSWI/SNF, ремоделера хроматина. Продукт гена *SMARCB1* играет важную роль в ингибировании канцерогенеза, пролиферации и дифференциации клеток (Pottier et al., 2007).

Ген *DERL3* кодирует фермент, участвующий в деградации люминальных гликопротеинов с некорректной третичной структурой, происходящей в эндоплазматическом ретикулуме (Oda et al., 2006). В данном локусе находится патогенный вариант rs3177243, расположенный в кодирующей последовательности гена *DERL3*.

Ген *CHCHD10* кодирует митохондриальный белок, встречающийся в фибриллах крист митохондрий. Показано, что генетическая ассоциация этого локуса с уровнями N-гликанов белков может быть опосредована влиянием нуклеотидных замен на экспрессию гена *CHCHD10* в клетках крови (Sharapov et al., 2019). Ранее непосредственное участие митохондриальных белков в процессах гликозилирования не было известно, однако в 2017 г. опубликована работа, показавшая роль фрагментации митохондрий и числа контактов эндоплазматического ретикулума с митохондриями в представленности сиалилированных гликанов на поверхности глиобластомных клеток, что, в свою очередь, влияло на узнавание лимфоцитами клеток глиобластомы (Martinvalet, 2018).

Локус на 14-й хромосоме, 105 м.п.н., содержит кластер генов *IGH*, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобули-

нов. Иммуноглобулин G (IgG) – наиболее представленный N-гликопротеин плазмы крови человека (Clerc et al., 2016), а его конститутивный сайт N-гликозилирования расположен в тяжелой цепи.

В локусе на 3-й хромосоме, 142 м.п.н., ген-кандидат – *SLC9A9*. Ген *SLC9A9* кодирует Na⁺/H насос, который, предположительно, регулирует уровень pH в аппарате Гольджи (АГ). Гликозилирование белков происходит в АГ, и, согласно имеющимся данным, этот процесс чувствителен к изменению pH (Kellokumpu, 2019). Процессы, происходящие в АГ, влияют на формирование гетеродимерных комплексов, осуществляющих гликозилирование (Hassinen et al., 2011). В работе (Rivinoja et al., 2009) продемонстрировано, что увеличение pH в АГ может нарушить терминальное N-гликозилирование (включая сиалилирование) из-за неверной локализации гликозилтрансфераз. Согласно этой гипотезе, в работе (Huffman et al., 2011) локус *SLC9A9* показал ассоциацию с уровнем тетрасиалилированных N-гликанов, а в работе (Sharapov et al., 2019) – с уровнем сиалилированных N-гликанов.

В локусе на 12-й хромосоме, 121 м.п.н., ген-кандидат – *HNF1A*. Подробное функциональное исследование этого локуса, проведенное G. Lauc с коллегами (Lauc et al., 2010a), выявило, что ген *HNF1A*, кодирующий фактор транскрипции гепатоцитов, регулирует экспрессию большинства генов, кодирующих фукозилтрансферазы, – *FUT3*, *FUT5*, *FUT6*, *FUT8*, *FUT10*, *FUT11* – в клеточной линии HepG2, полученной из клеток печени. В том же исследовании продемонстрировано, что *HNF1A* регулирует экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты для синтеза ГДФ-фукозы – субстрата для фукозилтрансфераз, что в совокупности говорит о ключевой роли гена *HNF1A* в процессах фукозилирования гликанов.

Для локуса на 7-й хромосоме в 50 м.п.н. ген-кандидат – *IKZF1*. Ранее в работе (Lauc et al., 2013) была найдена ассоциация данного локуса с гликозилированием IgG, в которой авторы предположили, что ген *IKZF1* является кандидатным для данного локуса. Ген *IKZF1* кодирует ДНК-связывающий белок Ikaros, – регулятор транскрипции, контролирующий процесс ремоделирования хроматина. Интересно, что локус *IKZF1* ассоциирован с уровнями N-гликанов белков плазмы крови с фукозилированием остова, с которыми был ассоциирован локус *FUT8* (Sharapov et al., 2019). *IKZF1* рассматривается как важный регулятор дифференциации лимфоцитов (Sellars et al., 2009; Marke et al., 2018).

Поскольку клетки, секретирующие IgG, – производные лимфоцитов, ген *IKZF1* был выбран в качестве кандидата в этом локусе. Была выдвинута гипотеза о его роли в регуляции фукозилирования остова N-гликанов IgG путем регуляции экспрессии гена *FUT8* (Sharapov et al., 2019). Более того, в исследовании (Klarić et al., 2020) экспериментальным путем установлено, что нокаун гена *IKZF1* в IgG секретирующих клетках *MATAT6* приводит к более чем трехкратному увеличению экспрессии *FUT8* и увеличению уровня фукозилирования секретируемого IgG.

В локусе на 1-й хромосоме, 25 м.п.н., ген-кандидат – *RUNX3*. Этот ген кодирует Runt-домен-содержащий бе-

лок – фактор транскрипции, который так же, как и ген *IKZF1* (Sellars et al., 2009), играет важную роль в созревании и дифференцировке В-лимфоцитов.

Гены-кандидаты для локуса *HLA* (локус главного комплекса гистосовместимости человека) на 6-й хромосоме, 25–32 м.п.н., не представлены, поскольку имеют высокий шанс быть ложноположительными. С точки зрения количественной генетики мультифакторных признаков человека локус *HLA* является уникальным (Kennedy et al., 2017). Этот локус имеет самую большую плотность генов в геноме человека, у него высочайшая степень полиморфности на нуклеотидном уровне. Аллели данного

локуса находятся в высоком неравновесии по сцеплению на протяжении всего локуса длиной в 8 м.п.н.

Генная сеть регуляции N-гликозилирования белков плазмы крови человека

В последних работах по изучению N-гликома плазмы крови (Sharapov et al., 2019, 2020) продемонстрирована достоверная ассоциация 15 локусов с 116 из 117 гликаных признаков. Суммарно 214 пар локус-признак показали достоверную ассоциацию. Эти данные были использованы в исследовании (Sharapov et al., 2019) для реконструкции генной сети регуляции уровней N-гликанов белков плазмы

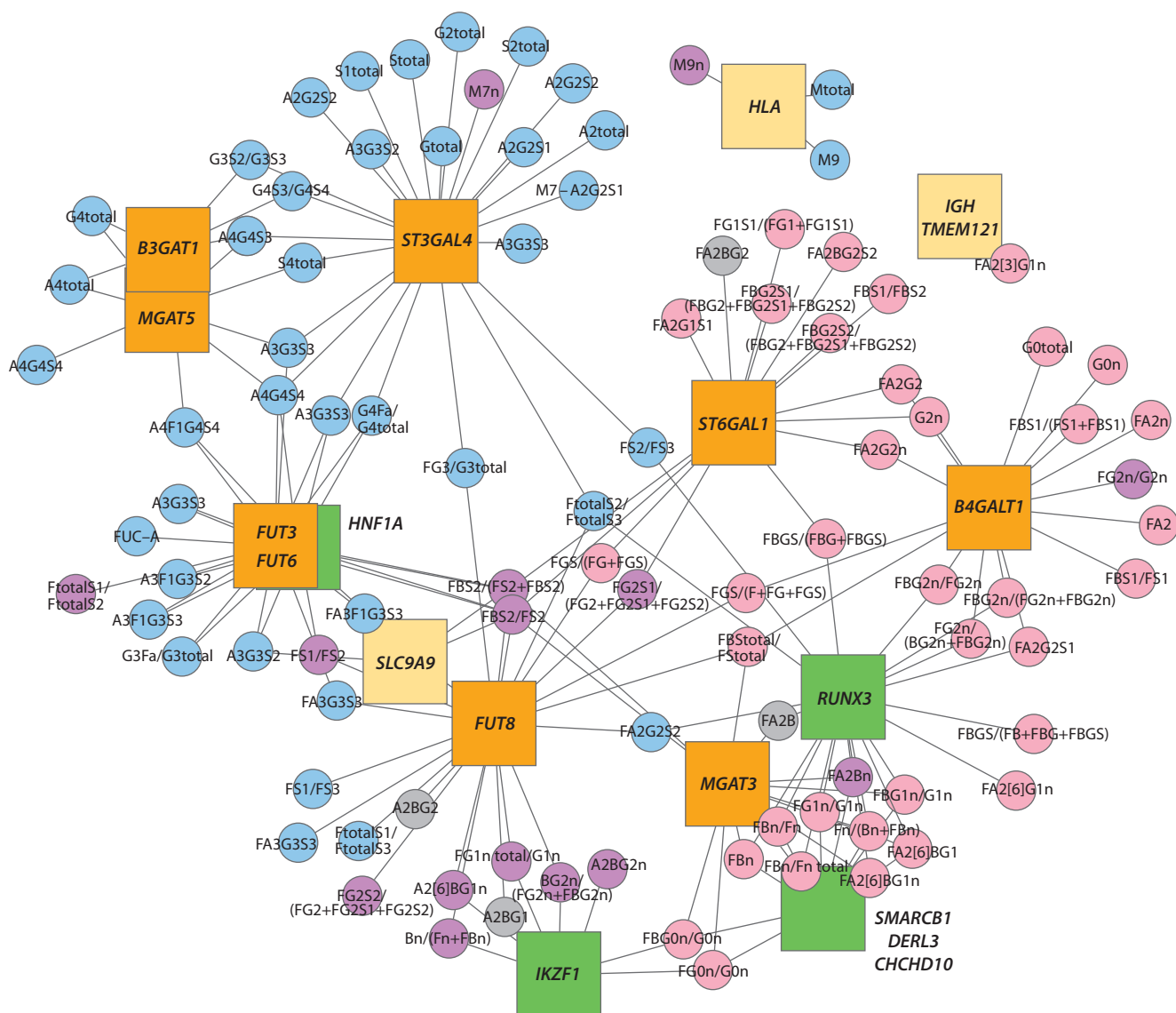


Рис. 5. Генная сеть регуляции уровней N-гликанов белков плазмы крови.

Квадратами обозначены локусы, найденные в настоящем исследовании. Для каждого локуса приведены названия приоритизированных генов. Оранжевым цветом выделены локусы, для которых были приоритизированы гены гликозилтрансфераз; зеленым – локусы, для которых были приоритизированы гены факторов транскрипции. Кругами обозначены уровни N-гликанов белков плазмы крови. Внутри круга приведено название гликана согласно оксфордской номенклатуре (см. раздел «Строение и разнообразие гликанов»). Синим цветом окрашены уровни N-гликанов, связанных с гликопротеинами, секретируемыми гепатоцитами; розовым – уровни N-гликанов, связанных с гликопротеинами (а именно иммуноглобулинами), секретируемыми клетками лимфоцитарного ряда; пурпурным – уровни N-гликанов, связанных как с гликопротеинами, секретируемыми гепатоцитами, так и с гликопротеинами, секретируемыми клетками лимфоцитарного ряда; серым – уровни N-гликанов, для которых классификация не проведена. Связи в сети обозначают генетическую ассоциацию с $p\text{-value} < 2.67 \cdot 10^{-5}$.

крови (рис. 5). Эта сеть визуализирует ассоциацию между найденными локусами и уровнями N-гликанов белков плазмы крови.

Для построения сети проведена классификация гликомных признаков. Признаки были классифицированы на четыре группы согласно ткани, секретирующей N-гликопротеины в плазму крови. Первая группа – признаки, отражающие уровни N-гликанов иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM), секретируемых клетками лимфоцитарного ряда – В-лимфоцитами, плазмобластами и плазмочитами. Вторая группа – признаки, отражающие уровни N-гликанов белков (трансферрин, гаптоглобин и т. д.), секретируемых в основном гепатоцитами – клетками печени. Третья группа – признаки, отражающие уровни N-гликанов белков, секретируемых как В-лимфоцитами и их потомками, так и гепатоцитами. Четвертая группа – неклассифицированные признаки. Классификация была проведена на основе данных представленности гликопротеинов, опубликованных в работе (Clerc et al., 2016), в которой исследователи оценили вклад каждого из N-гликопротеинов в N-гликом плазмы крови человека.

Локусы и ассоциированные признаки в этой сети могут быть визуально разделены на две частично перекрывающиеся подсети. Первая подсеть образована локусами *ST3GAL4*, *B3GAT1*, *MGAT5*, *HNF1A*, *FUT3/FUT6*, *FUT8* и *SLC9A9*. Эта подсеть ассоциирована с уровнями N-гликанов, связанных с N-гликопротеинами, секретируемыми в кровотоке клетками печени. Большинство из этих признаков отражает уровни N-гликанов с тремя или четырьмя антеннами, не встречающимися в составе иммуноглобулинов. В данную сеть входит локус *HNF1A* – транскрипционного фактора гепатоцитов. При этом локус *HNF1A* показал ассоциацию с теми же признаками, что и локус *FUT3/FUT6*, это соответствует ранее доказанной роли гена *HNF1A* в регуляции уровня экспрессии фукозилтрансфераз (Lauc et al., 2010a). Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о том, что эта подсеть генов регулирует процессы гликозилирования в гепатоцитах. Роль генов-кандидатов, входящих в эту сеть, следует проверять на клетках печени, например на гепатоцитах, или на клетках, близких к ним, например на клеточной линии HepG2.

Вторая подсеть образована локусами *FUT8*, *FUT6/FUT3*, *SLC9A9*, *IKZF1*, *MGAT3*, *RUNX3*, *SMARCB1/IDRL3/CHCHD10*, *B4GALT1*, *ST6GAL1* и *IGH/TMEM121*. Эти локусы ассоциированы с уровнями N-гликанов, связанных с иммуноглобулинами, секретируемыми в кровотоке клетками лимфоцитарного ряда. Более того, в исследованиях ПГИА уровней N-гликанов иммуноглобулина G было показано, что данные локусы ассоциированы с N-гликозилированием IgG (Shen et al., 2017; Klarić et al., 2020). Основываясь на том, что IgG является наиболее представленным гликопротеином плазмы крови, можно предположить: гены-кандидаты из данной сети регулируют процессы N-гликозилирования в В-лимфоцитах и их потомках. Роль генов-кандидатов, входящих в данную сеть, скорее всего, следует проверять на материале клеток, секретирующих антитела, или клеток, близких к ним.

В работе (Klarić et al., 2020) установлена роль транскрипционного фактора *IKZF1* в регуляции экспрессии

гена *FUT8* в лимфоидной линии *GM12878*. Нокдаун *IKZF1* приводил к повышению уровня фукозилированных белков, что доказывает роль фактора транскрипции *IKZF1* в регуляции фукозилирования белков в результате *in vitro* эксперимента.

В общей сложности с помощью метода полногеномного исследования ассоциаций были найдены 16 локусов, ассоциация 15 из которых подтверждена на независимых выборках. Для этих локусов было проведено *in silico* исследование и предложено 20 генов-кандидатов. В результате *in vitro* экспериментов доказаны роль фактора транскрипции *IKZF1* в регуляции фукозилирования белков и роль гена *HNF1A* в регуляции уровня экспрессии фукозилтрансфераз. Роль транскрипционного фактора *RUNX3* в регуляции N-гликозилирования подтверждена в результате таргетного редактирования генома (с использованием системы CRISPR-dCas9) в клеточных линиях VPR-dCas9 и KRAB-dCas9 HEK-293F, секретирующих IgG в среду. Сравнение профиля N-гликозилирования IgG с контрольной немодифицированной клеточной линией продемонстрировало, что увеличение экспрессии гена *RUNX3* приводит к значительному уменьшению галактозилированных структур с последующим увеличением агалактозилированных структур (Mijakovac et al., 2022).

Заключение

Результаты полногеномных исследований ассоциации уровней N-гликанов белков плазмы крови доказывают факт о том, что N-гликозилирование белков плазмы крови человека – это сложный процесс, который находится под контролем генов, принадлежащих разным биологическим путям и экспрессирующихся в разных тканях. Гены-кандидаты, предложенные в результате полномасштабного *in silico* исследования (Sharapov et al., 2019) подтвержденных локусов, позволяют выдвинуть функциональные гипотезы о механизмах влияния найденных локусов на N-гликозилирование белков плазмы крови. Эти гипотезы будут востребованы при планировании молекулярно-генетических *in vitro* и *in vivo* исследований гликома и изучения роли гликома в патогенезе социально и экономически важных заболеваний человека. Результаты проведенных экспериментов *in vitro* подкрепляют научную состоятельность функциональных гипотез о генах-кандидатах, выдвинутых с помощью метода ПГИА.

Существует несколько направлений развития популяционной гликогеномики человека. Будут проведены более мощные ПГИА уровней N-гликанов с применением выборок большего размера. Станут доступны новые данные функциональной геномики, применимые для изучения процессов N-гликозилирования, совместный анализ которых с результатами ПГИА позволит определить большее число локусов и потенциальных регуляторов N-гликозилирования. В настоящее время применение метода ПГИА для изучения регуляции гликозилирования ограничено анализом общего N-гликома плазмы крови, N-гликома IgG и трансферрина. Развитие технологий профилирования N-гликома расширит набор белков, для которых будут изучены индивидуальные профили N-гликозилирования. С другой стороны, скорее всего, появятся высокопроизводительные технологии профилирования N-гликома дру-

гих тканей человека. Все это позволит составить более полную картину регуляции N-гликозилирования белков человека, что, в свою очередь, даст возможность установить роль гликозилирования в патогенезе гликом-ассоциированных заболеваний и ускорить процессы разработки методов прогнозирования, профилактики, диагностики и лечения данных заболеваний.

Список литературы / References

- Akmačić I.T., Ugrina I., Štambuk J., Gudelj I., Vučković F., Lauc G., Pučić-Baković M. High-throughput glycomics: optimization of sample preparation. *Biochemistry (Mosc.)*. 2015;80(7):934-942. DOI 10.1134/S0006297915070123.
- Allegri M., De Gregori M., Minella C.E., Klersy C., Wang W., Sim M., Gieger C., Manz J., Pemberton I.K., MacDougall J., Williams F.M., Van Zundert J., Buyse K., Lauc G., Gudelj I., Primorac D., Skelin A., Aulchenko Y.S., Karssen L.C., Kapural L., Rauck R., Fanelli G., PainOMICS Group "Omics" biomarkers associated with chronic low back pain: protocol of a retrospective longitudinal study. *BMJ Open*. 2016;6(10):e012070. DOI 10.1136/bmjopen-2016-012070.
- Anthony R.M., Wermeling F., Ravetch J.V. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012;1253(1):170-180. DOI 10.1111/j.1749-6632.2011.06305.x.
- Boeing H., Korfmann A., Bergmann M.M. Recruitment procedures of EPIC-Germany. European Investigation into Cancer and Nutrition. *Ann. Nutr. Metab.* 1999;43(4):205-215. DOI 10.1159/000012787.
- Brockhausen I., Schachter H. Glycosyltransferases involved in N- and O-glycan biosynthesis. In: Gabius H.-J., Gabius S. (Eds.). *Glycosciences*. Weinheim: Chapman & Hall, 1997;79-113. DOI 10.1002/9783527614738.ch5.
- Bulik-Sullivan B., Finucane H.K., Anttila V., Gusev A., Day F.R., Loh P.-R., ReproGen Consortium, Psychiatric Genomics Consortium, Genetic Consortium for Anorexia Nervosa of the Wellcome Trust Case Control Consortium 3, Duncan L., Perry J.R.B., Patterson N., Robinson E.B., Daly M.J., Price A.L., Neale B.M. An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nat. Genet.* 2015;47(11):1236-1241. DOI 10.1038/ng.3406.
- Chauhan J.S., Rao A., Raghava G.P.S. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLoS One*. 2013;8(6):e67008. DOI 10.1371/journal.pone.0067008.
- Clerc F., Novokmet M., Dotz V., Reiding K.R., de Haan N., Kammeijer G.S.M., Dalebout H., Bladergroen M.R., Vukovic F., Rapp E., IBD-BIOM Consortium, Targan S.R., Barron G., Manetti N., Lattiano A., McGovern D.P.B., Annesse V., Lauc G., Wuhler M. Plasma N-glycan signatures are associated with features of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2018;155(3):829-843. DOI 10.1053/j.gastro.2018.05.030.
- Clerc F., Reiding K.R., Jansen B.C., Kammeijer G.S.M., Bondt A., Wuhler M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj. J.* 2016;33(3):309-343. DOI 10.1007/s10719-015-9626-2.
- Cobb B.A. The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology*. 2020;30(4):202-213. DOI 10.1093/glycob/cwz065.
- Connelly M.A., Gruppen E.G., Otvos J.D., Dullaart R.P.F. Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer. *Clin. Chim. Acta*. 2016;459:177-186. DOI 10.1016/j.cca.2016.06.012.
- Craveur P., Rebehmed J., de Brevern A.G. PTM-SD: a database of structurally resolved and annotated posttranslational modifications in proteins. *Database (Oxford)*. 2014;2014:bau041. DOI 10.1093/database/bau041.
- de Haan N., Pučić-Baković M., Novokmet M., Falck D., Lageveen-Kammeijer G., Razdorov G., Vučković F., Trbojević-Akmačić I., Gornik O., Hanić M., Wuhler M., Lauc G., The Human Glycome Project. Developments and perspectives in high-throughput protein glycomics: enabling the analysis of thousands of samples. *Glycobiology*. 2022;32(8):651-663. DOI 10.1093/glycob/cwaa026.
- Dotz V., Wuhler M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett.* 2019;593(21):2966-2976. DOI 10.1002/1873-3468.13598.
- Dupuy F., Germot A., Marends M., Oriol R., Blancher A., Julien R., Maftah A. α 1,4-fucosyltransferase activity: A significant function in the primate lineage has appeared twice independently. *Mol. Biol. Evol.* 2002;19(6):815-824. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004138.
- Egorova K.S., Smirnova N.S., Toukach P.V. CSDB_GT, a curated glycosyltransferase database with close-to-full coverage on three most studied nonanimal species. *Glycobiology*. 2021;31(5):524-529. DOI 10.1093/glycob/cwaa107.
- Ferlaino M., Rogers M.F., Shihab H.A., Mort M., Cooper D.N., Gaunt T.R., Campbell C. An integrative approach to predicting the functional effects of small indels in non-coding regions of the human genome. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):442. DOI 10.1186/s12859-017-1862-y.
- Fuster M.M., Esko J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer*. 2005;5(7):526-542. DOI 10.1038/nrc1649.
- Gagneux P., Aeby M., Varki A. Evolution of glycan diversity. In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aeby M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. (Eds.). 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017. Chapter 20. PMID 28876829. DOI 10.1101/glycobiology.3e.020.
- Gudelj I., Lauc G., Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell. Immunol.* 2018a;333:65-79. DOI 10.1016/j.cellimm.2018.07.009.
- Gudelj I., Salo P.P., Trbojević-Akmačić I., Albers M., Primorac D., Perola M., Lauc G. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018b;1864(6 Pt. A):2034-2039. DOI 10.1016/j.bbdis.2018.03.018.
- Harvey D.J., Merry A.H., Royle L., Campbell M.P., Dwek R.A., Rudd P.M. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics*. 2009;9(15):3796-3801. DOI 10.1002/pmic.200900096.
- Hassinen A., Pujol F.M., Kokkonen N., Pieters C., Kihlström M., Korhonen K., Kellokumpu S. Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2011;286(44):38329-38340. DOI 10.1074/jbc.M111.277681.
- Hemani G., Zheng J., Elsworth B., Wade K.H., Haberland V., Baird D., Laurin C., Burgess S., Bowden J., Langdon R., Tan V.Y., Yarmolinsky J., Shihab H.A., Timpson N.J., Evans D.M., Relton C., Martin R.M., Davey Smith G., Gaunt T.R., Haycock P.C. The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenotype. *Elife*. 2018;7:e34408. DOI 10.7554/elifesciences.34408.
- Huffman J.E., Knezevic A., Vitart V., Kattla J., Adamczyk B., Novokmet M., Igl W., Pucic M., Zgaga L., Johansson Å., Redzic I., Gornik O., Zemunik T., Polasek O., Kolcic I., Pehlic M., Koeleman C.A.M., Campbell S., Wild S.H., Hastie N.D., Campbell H., Gyllenstein U., Wuhler M., Wilson J.F., Hayward C., Rudan I., Rudd P.M., Wright A.F., Lauc G. Polymorphisms in *B3GAT1*, *SLC9A9* and *MGAT5* are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20(24):5000-5011. DOI 10.1093/hmg/ddr414.
- Huffman J.E., Pučić-Baković M., Klarić L., Hennig R., Selman M.H.J., Vučković F., Novokmet M., Krištić J., Borowiak M., Muth T., Polašek O., Razdorov G., Gornik O., Plomp R., Theodoratou E., Wright A.F., Rudan I., Hayward C., Campbell H., Deelder A.M., Reichl U., Aulchenko Y.S., Rapp E., Wuhler M., Lauc G. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol. Cell. Proteomics*. 2014;13(6):1598-1610. DOI 10.1074/mcp.M113.037465.

- Jain S., Gautam V., Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2011;3(1):118-127. DOI 10.4103/0975-7406.76489.
- Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M., Sato Y., Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D353-D361. DOI 10.1093/nar/gkw1092.
- Kellokumpu S. Golgi pH, ion and redox homeostasis: How much do they really matter? *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7:93. DOI 10.3389/fcell.2019.00093.
- Kennedy A.E., Ozbek U., Dorak M.T. What has GWAS done for HLA and disease associations? *Int. J. Immunogenet.* 2017;44(5):195-211. DOI 10.1111/iji.12332.
- Keser T., Gornik I., Vučković F., Selak N., Pavić T., Lukić E., Gudelj I., Gašparović H., Biočina B., Tilin T., Wennerström A., Männistö S., Salomaa V., Havulinna A., Wang W., Wilson J.F., Charutvedi N., Perola M., Campbell H., Lauc G., Gornik O. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2017;60(12):2352-2360. DOI 10.1007/s00125-017-4426-9.
- Khoury G.A., Baliban R.C., Floudas C.A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci. Rep.* 2011;1:90. DOI 10.1038/srep00090.
- Klarić L., Tsepilov Y.A., Stanton C.M., Mangino M., Sikka T.T., Esko T., Pakhomov E., ... Wilson J.F., Zoldoš V., Vitart V., Spector T., Aulchenko Y.S., Lauc G., Hayward C. Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci. Adv.* 2020;6(8):eaax0301. DOI 10.1126/sciadv.aax0301.
- Knezević A., Polasek O., Gornik O., Rudan I., Campbell H., Hayward C., Wright A., Kolcic I., O'Donoghue N., Bones J., Rudd P.M., Lauc G. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J. Proteome Res.* 2009;8(2):694-701. DOI 10.1021/pr800737u.
- Kukuruzinska M.A., Lennon K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1998; 9(4):415-448. DOI 10.1177/10454411980090040301.
- Landini A., Trbojević-Akmačić I., Navarro P., Tsepilov Y.A., Sharapov S.Z., Vučković F., Polašek O., Hayward C., Petrović T., Vilaj M., Aulchenko Y.S., Lauc G., Wilson J.F., Klarić L. Genetic regulation of post-translational modification of two distinct proteins. *Nat. Commun.* 2022;13(1):1586. DOI 10.1038/s41467-022-29189-5.
- Lauc G., Essafi A., Huffman J.E., Hayward C., Knežević A., Kattla J.J., Polašek O., ... Gyllenstein U., Wilson J.F., Wright A.F., Hastie N.D., Campbell H., Rudd P.M., Rudan I. Genomics meets glycomics: the first GWAS study of human N-glycome identifies HNF1α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet.* 2010a; 6(12):e1001256. DOI 10.1371/journal.pgen.1001256.
- Lauc G., Huffman J.E., Pučić M., Zgaga L., Adamczyk B., Mužinić A., Novokmet M., ... Wührer M., Wright A.F., Rudd P.M., Hayward C., Aulchenko Y., Campbell H., Rudan I. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and hematological cancers. *PLoS Genet.* 2013; 9(1):e1003225. DOI 10.1371/journal.pgen.1003225.
- Lauc G., Pezer M., Rudan I., Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1860(8):1574-1582. DOI 10.1016/j.bbagen.2015.10.016.
- Lauc G., Rudan I., Campbell H., Rudd P.M. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol. Biosyst.* 2010b;6(2):329-335. DOI 10.1039/b910377e.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):D490-D495. DOI 10.1093/nar/gkt1178.
- Marke R., van Leeuwen F.N., Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2018;103(4):565-574. DOI 10.3324/haematol.2017.185603.
- Martinvalet D. The role of the mitochondria and the endoplasmic reticulum contact sites in the development of the immune responses. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):336. DOI 10.1038/s41419-017-0237-7.
- McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R.S., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* 2016;17(1):122. DOI 10.1186/s13059-016-0974-4.
- Mehta A., Herrera H., Block T. Glycosylation and liver cancer. *Adv. Cancer Res.* 2015;126:257-279. DOI 10.1016/bs.acr.2014.11.005.
- Mijakovac A., Miškec K., Krištić J., Vičić Bočkor V., Tadić V., Bošković M., Lauc G., Zoldoš V., Vojta A. A transient expression system with stably integrated CRISPR-dCas9 fusions for regulation of genes involved in immunoglobulin G glycosylation. *CRISPR J.* 2022;5(2):237-253. DOI 10.1089/crispr.2021.0089.
- Mizushima T., Yagi H., Takemoto E., Shibata-Koyama M., Isoda Y., Iida S., Masuda K., Satoh M., Kato K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells.* 2011;16(11):1071-1080. DOI 10.1111/j.1365-2443.2011.01552.x.
- Moayyeri A., Hammond C.J., Hart D.J., Spector T.D. The UK adult twin registry (TwinsUK resource). *Twin Res. Hum. Genet.* 2013; 16(1):144-149. DOI 10.1017/thg.2012.89.
- Mohanty S., Chaudhary B., Zoetewey D. Structural insight into the mechanism of N-linked glycosylation by oligosaccharyltransferase. *Biomolecules.* 2020;10(4):624. DOI 10.3390/biom10040624.
- Moremen K.W., Tiemeyer M., Nairn A.V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(7):448-462. DOI 10.1038/nrm3383.
- Mulloy B., Dell A., Stanley P., H. Prestegard J. Structural analysis of glycans. In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. (Eds.). Essentials of Glycobiology. [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Chapter 50, 2017. DOI 10.1101/glycobiology.3e.050.
- Nairn A.V., Aoki K., dela Rosa M., Porterfield M., Lim J.-M., Kulik M., Pierce J.M., Wells L., Dalton S., Tiemeyer M., Moremen K.W. Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 2012;287(45):37835-37856. DOI 10.1074/jbc.m112.405233.
- Nairn A.V., York W.S., Harris K., Hall E.M., Pierce J.M., Moremen K.W. Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J. Biol. Chem.* 2008;283(25):17298-17313. DOI 10.1074/jbc.M801964200.
- Nikolac Perkovic M., Pucic Bakovic M., Kristic J., Novokmet M., Huffman J.E., Vitart V., Hayward C., Rudan I., Wilson J.F., Campbell H., Polasek O., Lauc G., Pivac N. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2014;48:20-25. DOI 10.1016/j.pnpbp.2013.08.014.
- Oda Y., Okada T., Yoshida H., Kaufman R.J., Nagata K., Mori K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.* 2006;172(3):383-393. DOI 10.1083/jcb.200507057.
- Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 2006;126(5):855-867. DOI 10.1016/j.cell.2006.08.019.
- Pasaniuc B., Price A.L. Dissecting the genetics of complex traits using summary association statistics. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(2):117-127. DOI 10.1038/nrg.2016.142.
- Peipp M., Lammerts van Bueren J.J., Schneider-Merck T., Bleeker W.W.K., Dechant M., Beyer T., Repp R., van Berkel P.H.C., Vink T., van de Winkel J.G.J., Parren P.W.H.I., Valerius T. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood.* 2008;112(6):2390-2399. DOI 10.1182/blood-2008-03-144600.
- Pers T.H., Karjalainen J.M., Chan Y., Westra H.-J., Wood A.R., Yang J., Lui J.C., Vedantam S., Gustafsson S., Esko T., Frayling T., Speliotes E.K., Boehnke M., Raychaudhuri S., Fehrmann R.S.N.,

- Hirschhorn J.N., Franke L. Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions. *Nat. Commun.* 2015;6(1):5890. DOI 10.1038/ncomms6890.
- Poole J., Day C.J., von Itzstein M., Paton J.C., Jennings M.P. Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16(7):440-452. DOI 10.1038/s41579-018-0007-2.
- Pottier N., Cheok M.H., Yang W., Assem M., Tracey L., Obenaus J.C., Panetta J.C., Relling M.V., Evans W.E. Expression of SMARCB1 modulates steroid sensitivity in human lymphoblastoid cells: identification of a promoter SNP that alters PARP1 binding and SMARCB1 expression. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(19):2261-2271. DOI 10.1093/hmg/ddm178.
- Reiding K.R., Bondt A., Hennig R., Gardner R.A., O'Flaherty R., Trbojević-Akmačić I., Shubhakar A., Hazes J.M.W., Reichl U., Fernandes D.L., Pučić-Baković M., Rapp E., Spencer D.I.R., Dolhain R.J.E.M., Rudd P.M., Lauc G., Wuhrer M. High-throughput serum N-glycomics: method comparison and application to study rheumatoid arthritis and pregnancy-associated changes. *Mol. Cell. Proteomics.* 2019;18(1):3-15. DOI 10.1074/mcp.RA117.000454.
- Reily C., Stewart T.J., Renfrow M.B., Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2019;15(6):346-366. DOI 10.1038/s41581-019-0129-4.
- Rivinoja A., Hassinen A., Kokkonen N., Kauppi A., Kellokumpu S. Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J. Cell. Physiol.* 2009; 220(1):144-154. DOI 10.1002/jcp.21744.
- Rogers M., Shihab H.A., Mort M., Cooper D., Gaunt T.R., Campbell C. FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics.* 2018;34(3):511-513. DOI 10.1093/bioinformatics/btx536.
- Russell A.C., Šimurina M., Garcia M.T., Novokmet M., Wang Y., Rudan I., Campbell H., Lauc G., Thomas M.G., Wang W. The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson's disease. *Glycobiology.* 2017;27(5):501-510. DOI 10.1093/glycob/cwx022.
- Saito M., Ishii A. T3Gal-V (GM3 synthase, SAT-I). In: Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Tokyo: Springer, 2002; 289-294. DOI 10.1007/978-4-431-67877-9_39.
- Saldova R., Asadi Shehni A., Haakensen V.D., Steinfeld I., Hilliard M., Kifer I., Helland A., Yakhini Z., Børresen-Dale A.-L., Rudd P.M. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J. Proteome Res.* 2014;13(5):2314-2327. DOI 10.1021/pr401092y.
- Sellers M., Reina-San-Martin B., Kastner P., Chan S. Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 2009;206(5):1073-1087. DOI 10.1084/jem.2008.2311.
- Shadrina A.S., Zlobin A.S., Zaytseva O.O., Klarić L., Sharapov S.Z., Pakhomov E., Perola M., Esko T., Hayward C., Wilson J.F., Lauc G., Aulchenko Y.S., Tsepilov Y.A. Multivariate genome-wide analysis of immunoglobulin G N-glycosylation identifies new loci pleiotropic with immune function. *Hum. Mol. Genet.* 2021;30(13):1259-1270. DOI 10.1093/hmg/ddab072.
- Sharapov S.Z., Shadrina A.S., Tsepilov Y.A., Elgaeva E.E., Tiys E.S., Feoktistova S.G., Zaytseva O.O., ... Dagostino C., Gieger C., Allegri M., Williams F., Schulze M.B., Lauc G., Aulchenko Y.S. Replication of fifteen loci involved in human plasma protein N-glycosylation in 4,802 samples from four cohorts. *Glycobiology.* 2020; 31(2):82-88. DOI 10.1093/glycob/cwaa053.
- Sharapov S.Z., Tsepilov Y.A., Klarić L., Mangino M., Thareja G., Shadrina A.S., Šimurina M., ... Louis E., Georges M., Suhre K., Spector T., Williams F.M.K., Lauc G., Aulchenko Y.S. Defining the genetic control of human blood plasma N-glycome using genome-wide association study. *Hum. Mol. Genet.* 2019;28(12):2062-2077. DOI 10.1093/hmg/ddz054.
- Shen X., Klarić L., Sharapov S., Mangino M., Ning Z., Wu D., Trbojević-Akmačić I., Pučić-Baković M., Rudan I., Polašek O., Hayward C., Spector T.D., Wilson J.F., Lauc G., Aulchenko Y.S. Multivariate discovery and replication of five novel loci associated with Immunoglobulin G N-glycosylation. *Nat. Commun.* 2017;8(1):447. DOI 10.1038/s41467-017-00453-3.
- Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2009;17(7):2645-2653. DOI 10.1016/j.bmc.2009.02.037.
- Spector T.D., Williams F.M.K. The UK adult twin registry (TwinsUK). *Twin Res. Hum. Genet.* 2006;9(6):899-906. DOI 10.1375/183242706779462462.
- Staley J.R., Blackshaw J., Kamat M.A., Ellis S., Surendran P., Sun B.B., Paul D.S., Freitag D., Burgess S., Danesh J., Young R., Butterworth A.S. PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinformatics.* 2016;32(20):3207-3209. DOI 10.1093/bioinformatics/btw373.
- Staretz-Chacham O., Noyman I., Wormser O., Abu Quider A., Hazan G., Morag I., Hadar N., Raymond K., Birk O.S., Ferreira C.R., Koifman A. B4GALT1-congenital disorders of glycosylation: Expansion of the phenotypic and molecular spectrum and review of the literature. *Clin. Genet.* 2020;97(6):920-926. DOI 10.1111/cge.13735.
- Taniguchi N., Honke K., Fukuda M., Narimatsu H., Yamaguchi Y., Angata T. (Eds.). Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Tokyo: Springer, 2014. DOI 10.1007/978-4-431-54240-7.
- Taniguchi N., Kizuka Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv. Cancer Res.* 2015;126:11-51. DOI 10.1016/bs.acr.2014.11.001.
- Thanabalasingham G., Huffman J.E., Kattla J.J., Novokmet M., Rudan I., Gloyd A.L., Hayward C., ... Hastie N.D., Campbell H., McCarthy M.I., Rudd P.M., Owen K.R., Lauc G., Wright A.F. Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes.* 2013;62(4):1329-1337. DOI 10.2337/db12-0880.
- Theodoratou E., Thači K., Agakov F., Timofeeva M.N., Štambuk J., Pučić-Baković M., Vučković F., Orchard P., Agakova A., Din F.V.N., Brown E., Rudd P.M., Farrington S.M., Dunlop M.G., Campbell H., Lauc G. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. *Sci. Rep.* 2016;6:28098. DOI 10.1038/srep28098.
- Tillin T., Forouhi N.G., McKeigue P.M., Chaturvedi N., SABRE Study Group. Southall and Brent REvisited: Cohort profile of SABRE, a UK population-based comparison of cardiovascular disease and diabetes in people of European, Indian Asian and African Caribbean origins. *Int. J. Epidemiol.* 2012;41(1):33-42. DOI 10.1093/ije/dyq175.
- Trbojević Akmačić I., Ventham N.T., Theodoratou E., Vučković F., Kennedy N.A., Kristić J., Nimmo E.R., Kalla R., Drummond H., Štambuk J., Dunlop M.G., Novokmet M., Aulchenko Y., Gornik O., Campbell H., Pučić Baković M., Satsangi J., Lauc G. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015;21(6):1237-1247. DOI 10.1097/mib.0000000000000372.
- Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., ... Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015; 347(6220):1260419. DOI 10.1126/science.1260419.
- Uhlén M., Karlsson M.J., Hober A., Svensson A.-S., Scheffel J., Kotol D., Zhong W., ... Voldborg B.G., Tegel H., Hober S., Forsström B., Schwenk J.M., Fagerberg L., Sivertsson Å. The human secretome. *Sci. Signal.* 2019;12(609):eaaz0274. DOI 10.1126/scisignal.aaz0274.
- Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 1993;3(2):97-130. DOI 10.1093/glycob/3.2.97.
- Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. (Eds.). Essentials of Glycobiology. [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- Varki A., Kornfeld S. Historical background and overview. In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Dar-

- vill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. (Eds.). *Essentials of Glycobiology*. [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- Vilaj M., Lauc G., Trbojević-Akmačić I. Evaluation of different PNGase F enzymes in immunoglobulin G and total plasma N-glycans analysis. *Glycobiology*. 2021;31(1):2-7. DOI 10.1093/glycob/cwaa047.
- Visscher P.M., Brown M.A., McCarthy M.I., Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(1):7-24. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.11.029.
- Visscher P.M., Wray N.R., Zhang Q., Sklar P., McCarthy M.I., Brown M.A., Yang J. 10 years of GWAS discovery: Biology, function, and translation. *Am. J. Hum. Genet.* 2017;101(1):5-22. DOI 10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
- Vreeker G.C.M., Nicolardi S., Bladergroen M.R., van der Plas C.J., Mesker W.E., Tollenaar R.A.E.M., van der Burgt Y.E.M., Wührer M. Automated plasma glycomics with linkage-specific sialic acid esterification and ultrahigh resolution MS. *Anal. Chem.* 2018;90(20):11955-11961. DOI 10.1021/acs.analchem.8b02391.
- Vučković F., Theodoratou E., Thači K., Timofeeva M., Vojta A., Štambuk J., Pučić-Baković M., Rudd P.M., Đerek L., Servis D., Wennerström A., Farrington S.M., Perola M., Aulchenko Y., Dunlop M.G., Campbell H., Lauc G. IgG glycome in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(12):3078-3086. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-15-1867.
- Wahl A., van den Akker E., Klaric L., Štambuk J., Benedetti E., Plomp R., Razdorov G., Trbojević-Akmačić I., Deelen J., van Heemst D., Slagboom P.E., Vučković F., Grallert H., Krumsiek J., Strauch K., Peters A., Meitinger T., Hayward C., Wührer M., Beekman M., Lauc G., Gieger C. Genome-wide association study on immunoglobulin G glycosylation patterns. *Front. Immunol.* 2018;9:277. DOI 10.3389/fimmu.2018.00277.
- Wang Y., Klarić L., Yu X., Thači K., Dong J., Novokmet M., Wilson J., Polasek O., Liu Y., Krištić J., Ge S., Pučić-Baković M., Wu L., Zhou Y., Ugrina I., Song M., Zhang J., Guo X., Zeng Q., Rudan I., Campbell H., Aulchenko Y., Lauc G., Wang W. The association between glycosylation of immunoglobulin G and hypertension. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(17):e3379. DOI 10.1097/md.0000000000003379.
- Winkler T.W., Day F.R., Croteau-Chonka D.C., Wood A.R., Locke A.E., Mägi R., Ferreira T., Fall T., Graff M., Justice A.E., Luan J., Gustafsson S., Randall J.C., Vedantam S., Workalemahu T., Kilpeläinen T.O., Scherag A., Esko T., Kutalik Z., Heid I.M., Loos R.J.F., Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) Consortium. Quality control and conduct of genome-wide association meta-analyses. *Nat. Protoc.* 2014;9(5):1192-1212. DOI 10.1038/nprot.2014.071.
- Yang J., Ferreira T., Morris A.P., Medland S.E., Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) Consortium, DIAbetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Madden P.A.F., Heath A.C., Martin N.G., Montgomery G.W., Weedon M.N., Loos R.J., Frayling T.M., McCarthy M.I., Hirschhorn J.N., Goddard M.E., Visscher P.M. Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits. *Nat. Genet.* 2012;44(4):369-375. DOI 10.1038/ng.2213.
- Zaytseva O.O., Freidin M.B., Keser T., Štambuk J., Ugrina I., Šimurina M., Vilaj M., Štambuk T., Trbojević-Akmačić I., Pučić-Baković M., Lauc G., Williams F.M.K., Novokmet M. Heritability of human plasma N-glycome. *J. Proteome Res.* 2020;19(1):85-91. DOI 10.1021/acs.jproteome.9b00348.
- Zhu Z., Zhang F., Hu H., Bakshi A., Robinson M.R., Powell J.E., Montgomery G.W., Goddard M.E., Wray N.R., Visscher P.M., Yang J. Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nat. Genet.* 2016;48(5):481-487. DOI 10.1038/ng.3538.

ORCID ID

S.Zh. Sharapov orcid.org/0000-0003-0279-4900
A.N. Timoshchuk orcid.org/0000-0001-8529-4498
Y.S. Aulchenko orcid.org/0000-0002-7899-1575

Благодарности. Исследование осуществлено в рамках Программы исследований Института искусственного интеллекта при МГУ. Работа Ю.А. частично поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.11.2022. После доработки 20.01.2023. Принята к публикации 23.01.2023.

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

Видовая идентификация паутинных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae): обзор методов

А.В. Разуваева¹, Е.Г. Ульянова², Е.С. Сколотнева¹✉, И.В. Андреева²

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

² Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

✉ skoltnevaES@bionet.nsc.ru

Аннотация. Паутинные клещи (Acari: Tetranychidae) являются опасными вредителями сельскохозяйственных и декоративных культур; наиболее экономически значимые из них относятся к родам *Tetranychus*, *Eutetranychus*, *Oligonychus* и *Panonychus*. Расширение ареалов распространения, усиление вредоносности и статуса по степени опасности отдельных видов тетранихид, инвазия опасных вредителей в новые регионы представляют серьезную угрозу для фитосанитарного состояния агро- и биocenozов. Различные подходы к видовой диагностике акарофауны определяют достаточно разнообразный спектр существующих в настоящее время методов, общая информация по которым приведена в данном обзоре. Идентификация паутинных клещей по морфологическим признакам, считающаяся основным методом, осложнена вследствие трудоемкости подготовки биоматериала для диагностики и ограниченного числа диагностических признаков. В связи с этим важное значение приобретают биохимические и молекулярно-генетические методы, такие как аллозимный анализ, ДНК-штрихкодирование, полиморфизм длины рестрикционного фрагмента (ПЦР-ПДРФ), подбор видоспецифичных праймеров, ПЦР в реальном времени и изотермическая амплификация. В обзоре пристальное внимание уделено успехам применения этих методов для видовой дискриминации клещей подсемейства Tetranychinae. Для некоторых видов, например обыкновенного паутинового клеща (*Tetranychus urticae*), разработан спектр методов идентификации – от аллозимного анализа до петлевой изотермической амплификации (LAMP), тогда как для многих других видов доступно гораздо меньшее разнообразие подходов. Наибольшей точности в определении паутинных клещей можно добиться, используя комбинацию нескольких методов, например осмотр морфологических признаков и один из молекулярных подходов (ДНК-штрихкодирование, ПЦР-ПДРФ и др.). Обзор может быть полезен специалистам, находящимся в поиске эффективной системы для видовой дискриминации паутинных клещей, а также при разработке новых тест-систем, актуальных для конкретных культур растений или определенного региона.

Ключевые слова: паутинные клещи; молекулярная идентификация; аллозимный анализ; MALDI-TOF MS; ДНК-штрихкодирование; ПЦР-ПДРФ; ITS; COI.

Для цитирования: Разуваева А.В., Ульянова Е.Г., Сколотнева Е.С., Андреева И.В. Видовая идентификация паутинных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae): обзор методов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(3): 240-249. DOI 10.18699/VJGB-23-30

Species identification of spider mites (Tetranychidae: Tetranychinae): a review of methods

A.V. Razuvaeva¹, E.G. Ulyanova², E.S. Skoltneva¹✉, I.V. Andreeva²

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

² Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia

✉ skoltnevaES@bionet.nsc.ru

Abstract. Spider mites (Acari: Tetranychidae) are dangerous pests of agricultural and ornamental crops, the most economically significant of them belonging to the genera *Tetranychus*, *Eutetranychus*, *Oligonychus* and *Panonychus*. The expansion of the distribution areas, the increased harmfulness and dangerous status of certain species in the family Tetranychidae and their invasion of new regions pose a serious threat to the phytosanitary status of agro- and biocenoses. Various approaches to acarofauna species diagnosis determine a rather diverse range of currently existing methods generally described in this review. Identification of spider mites by morphological traits, which is currently considered the main method, is complicated due to the complexity of preparing biomaterials for diagnosis and a limited number of diagnostic signs. In this regard, biochemical and molecular genetic methods such as allozyme analysis, DNA barcoding, restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), selection of species-specific primers and real-time PCR are becoming important. In the review, close attention is paid to the successful use of these methods for species discrimination in the mites of the subfamily Tetranychinae. For some species, e.g., the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*), a range of identification methods has been developed – from allozyme analysis to loop isothermal amplification (LAMP), while for many other species a much smaller variety of approaches is available.

The greatest accuracy in the identification of spider mites can be achieved using a combination of several methods, e.g., examination of morphological features and one of the molecular approaches (DNA barcoding, PCR-RFLP, etc.). This review may be useful to specialists who are in search of an effective system for spider mite species identification as well as when developing new test systems relevant to specific plant crops or a specific region.

Key words: spider mites; species identification; allozyme analysis; MALDI-TOF MS; DNA barcoding; PCR-RFLP; ITS; COI.

For citation: Разуваева А.В., Ульянова Е.Г., Сколотнева Е.С., Андреева И.В. Species identification of spider mites (Tetranychidae: Tetranychinae): a review of methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):240-249. DOI 10.18699/VJGB-23-30

Введение

Растительноядные клещи наносят значительный ущерб сельскохозяйственным и декоративным культурам. Вредоносность клещей-фитофагов проявляется в снижении урожайности и ухудшении качества растениеводческой продукции, приводит к снижению засухоустойчивости и зимостойкости культур, а также к потере декоративных свойств выращиваемых растений (Devi et al., 2019; Chaires-Grijalva et al., 2021; Obasa et al., 2022; Ulyanova et al., 2022). Изменение погодно-климатических условий практически во всех регионах мира, в том числе в Российской Федерации, способствует более широкому распространению и массовому размножению вредителей, трансформации их географических ареалов, изменению динамики популяций фитофагов и трофических связей с растением-хозяином (Мусолин, Саулич, 2012; Зейналов, 2017; Кошкин и др., 2021), что в полной мере относится и к растительноядной акарофауне (Волкова, Матвейкина, 2016; Зейналов, Орел, 2021). Расширение ареалов обитания, усиление вредоносности, появление резистентных к акарицидам популяций наблюдаются в последнее время у паутиных клещей (Acari: Tetranychidae) (Балыкина и др., 2017; Зейналов, Орел, 2021) – одной из основных групп клещей-фитофагов. Фитосанитарная ситуация осложняется из-за высокого риска интродукции карантинных видов с растительным материалом, ввезенным в рамках международной торговли для целей выращивания, размножения и реализации цветочной и другой продукции растительного происхождения (Рак, Литвинова, 2010; Петров и др., 2016; Камаев, 2018; Камаев, Миронова, 2018; Vásquez, Colmenárez, 2020).

Семейство Tetranychidae подразделяется на два подсемейства – Bryobiinae и Tetranychinae – и включает не менее 71 рода и более 1250 описанных видов, 100 из которых считаются опасными вредителями (Migeon et al., 2010). Наиболее распространенные виды семейства тетраниховых клещей (Tetranychidae) относятся к родам *Tetranychus*, *Eutetranychus*, *Oligonychus* и *Panonychus* (Ben-David et al., 2007). В частности, особо значимыми по вредоносности видами являются обыкновенный паутинный *Tetranychus urticae* Koch. и европейский красный плодовый *Panonychus ulmi* Koch. клещи (Ben-David et al., 2007). *Tetranychus urticae* распространен повсеместно и повреждает широкий круг сельскохозяйственных культур, а также декоративные древесные и травянистые растения из разных ботанических семейств. При этом ареалы обитания обыкновенного паутинного клеща и других представителей этого семейства в агро- и биоценозах открытого грунта постепенно расширяются и охватывают все большие

территории России (Камаев, Карпун, 2020; Ulyanova et al., 2022). Усиливается вредоносность паутиных клещей, повреждающих хвойные растения. Так, в условиях юга Западной Сибири приобрел практическое значение еловый паутинный клещ *Oligonychus ununguis* Jacobi, повреждающий обыкновенную и сибирскую ели, пихту сибирскую, используемые для озеленения урбанизированных территорий (Ulyanova et al., 2022). Возрастает риск завоза с импортным посадочным материалом имеющих статус карантинных вредителей. Например, в Краснодарском крае обнаружен инвазионный для данного региона вид *Oligonychus hondoensis* Ehara (Камаев, Карпун, 2020).

Правильная идентификация видов паутиных клещей имеет важное научное и практическое значение для исследования динамики популяций, своевременного контроля их численности в агро- и биоценозах, а также для устранения международных торговых барьеров в отношении карантина растений (Li et al., 2015). В настоящее время для диагностики представителей семейства Tetranychidae используется несколько методов, включая идентификацию по морфологическим характеристикам взрослых особей, биохимические (на основе белков) и молекулярные (на основе ДНК) методы. Цель статьи – обзор современных методов и подходов, применяемых для идентификации наиболее распространенных видов тетраниховых клещей (Tetranychidae: Tetranychinae).

Морфологические методы

В настоящее время идентификация растительноядных клещей проводится преимущественно традиционными методами, основанными на визуальном осмотре морфологических признаков. Основы морфологического метода при определении акарофауны паутиных клещей были заложены в бывшем СССР видными учеными В.И. Митрофановым, И.З. Лившиц, З.И. Струнковой, внесшими огромный вклад в создание целого направления научных исследований по видовой диагностике тетранихид (Митрофанов и др., 1987). Дальнейшее развитие этого метода нашло свое продолжение в научно-исследовательских и прикладных работах С.Я. Попова с коллегами (Попов, 2013), А.К. Ахатова (2016) и др., не потерявших своей актуальности до сих пор.

Определение тетраниховых клещей до рода и вида обычно осуществляется по форме и размеру гениталий самцов (Morphological Identification..., 2014). Микроскопические размеры клещей, незначительные различия диагностических признаков у видов, относящихся к одному роду, трудоемкость в подготовке биоматериала для анализа значительно осложняют идентификацию клещей (Коноплев

и др., 2017). Недостатком метода является также невозможность определения вида по другим стадиям развития клещей (яйца, личинки, нимфы), так как диагностические отличия имеются только у взрослых особей. Кроме того, для некоторых близкородственных видов морфологическая идентификация практически невозможна; например, род *Amphitetranynchus* включает три вида, и только один из них, *A. viennensis*, можно распознать по форме эдеагуса, тогда как *A. quercivorus* и *A. savenkoe* трудно разделить по этому признаку (Arabuli et al., 2019).

Микропрепараты клещей готовят с использованием модифицированных сред Фора–Берлезе, из которых самая распространенная для фиксации растительных клещей – среда Хойера (Walter, Krantz, 2009). В ее состав входит 50 мл дистиллированной воды, 30 мл гуммиарабика, 200 мл хлоралгидрата, 20 мл глицерина. Клещей помещают в каплю среды на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Препарат прогревают при температурах 40–60 °С, при этом время экспозиции варьирует от 24 ч до 5–10 дней либо составляет 3 ч при 70–85 °С (Камаев, 2019), что способствует просветлению и распрямлению объекта, после чего можно приступить к его идентификации. При необходимости длительного хранения микропрепаратов рекомендуется дальнейшее их просушивание в термостате при температуре 40–45 °С в течение 5–7 суток. После этой процедуры края покровных стекол заливают лаком. Подготовленные таким образом микропрепараты могут храниться бесконечно долго. Идентификацию клещей проводят при проходящем свете с помощью фазово-контрастного микроскопа при увеличении 10–1000 раз.

В целом морфологический метод требует значительных временных затрат, высокой квалификации и опыта специалистов. В некоторых случаях идентификация клещей по морфологическим признакам дополняется экологическими и поведенческими реакциями вида, а также информацией по растению-хозяину, на котором был найден вид, что облегчает определение вида (Ахатов, 2016). Некоторые особенности жизненного цикла, такие как диапаузирующая фаза, места зимовки, выход из диапаузы, концентрация на определенных органах растений-хозяев, специфика симптомов повреждений, могут сыграть важную роль в диагностике вида.

Скрещивание видов

Генетическая несовместимость при скрещивании близкородственных видов тетраниховых клещей считается одним из лучших критериев для их дискриминации. Репродуктивные барьеры могут быть обусловлены либо морфологическими особенностями (величиной бородки эдеагуса, превышающей размеры эпигины самки), либо гибелью зигот, что отражается на жизнеспособности яиц или проявляется в различном соотношении полов в потомстве. Так, эксперименты отечественных исследователей по скрещиванию между видами *Tetranychus atlanticus*, *T. urticae* и *T. sawzdargi* показали их полную генетическую изоляцию (Попов, 2013). Репродуктивная изоляция двух морфологически близких видов *Amphitetranynchus* spp., проявившаяся в отсутствии женского потомства, была под-

тверждена при реципрокном скрещивании *A. savenkoe* и *A. quercivorus* (Arabuli et al., 2019).

Сочетание морфологического метода диагностики паутинных клещей с результатами скрещиваний близких или отдаленных видов, по мнению ряда ученых (Попов, 2013; Arabuli et al., 2019), является надежным критерием для идентификации видов. Однако стоит отметить, что изучение генетической совместимости путем скрещивания видов применимо только в научных целях. Для практической деятельности этот метод неприемлем.

Биохимические методы

Одним из биохимических методов идентификации видов паутинных клещей является **аллозимный анализ**. В основе метода лежит электрофорез белка, который позволяет эффективно выявлять полиморфизм энзимов (Navajas, Fenton, 2000). Для выполнения аллозимного анализа отдельную особь гомогенизируют, выделяют белковый экстракт и подвергают его электрофорезу. Под действием электрического поля белки разделяются в соответствии с размером и суммарным электрическим зарядом. После электрофореза гель гистохимически окрашивают для выявления определенных ферментов. По числу и расположению окрашенных фракций в геле можно судить об аллелях, кодирующих данный фермент у каждой отдельной особи (Кутлунина, Ермошин, 2017). Для корректной идентификации важно выбирать ту ферментную систему, в которой не будет изменчивости в полосовых паттернах внутри вида (полиморфные аллели) и общих полос у разных видов (Gotoh et al., 2007).

Аллозимный анализ широко использовался для идентификации насекомых (Turak, Hales, 1994) и иксодовых клещей (Lampo et al., 1997). Имеется опыт применения данного метода и для идентификации паутинных клещей, при этом часто используют такие ферменты, как эстеразу, фосфоглюкозомеразу и малатдегидрогеназу (Enohara, Amano, 1996; Goka, Takafuji, 1998; Gotoh et al., 2004, 2007; Arabuli et al., 2019). Впервые при помощи аллозимного анализа эстераз были идентифицированы паутинные клещи *Panonychus citri* и *P. mori* (Osakabe, 1987). Позже было показано, что этим же методом можно определять еще три вида клещей рода *Panonychus*, обитающих в Японии (Gotoh, 1992) (см. таблицу). Т. Gotoh с коллегами (Gotoh et al., 2007), используя зимограммы эстеразы, смогли различить самок четырех видов рода *Tetranychus*, а на основе анализа изоферментов фосфоглюкомутазы – все 13 японских видов рода *Tetranychus* (см. таблицу). Аллозимный анализ на основе эстераз использовали также для видовой диагностики представителей рода *Amphitetranynchus* (Arabuli et al., 2019). Полученные зимограммы эстераз были видоспецифичными и позволяли с уверенностью различить все три вида (см. таблицу).

Таким образом, аллозимный анализ является эффективным инструментом для идентификации видов паутинных клещей и обладает значительно большей разрешающей способностью, чем разнообразие по морфологическим признакам. Однако он не оценивает все возможные варианты аллелей, присутствующие в популяциях (Алтухов, 2003).

Другой биохимический метод, предложенный для идентификации паутиных клещей, – **времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией** (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) (Kajiwar et al., 2016). MALDI-TOF MS хорошо зарекомендовал себя для идентификации видов микроорганизмов (Singhal et al., 2015). В последние годы этот метод был использован также по отношению к вредителям растений и насекомым, например нематодам, плодовым мухам *Drosophila*, комарам и др. (Ahmad et al., 2012).

Идентификация видов при помощи MALDI-TOF MS-типирования достигается путем сопоставления спектров исследуемых образцов с образцами спектральной базы данных, созданной на основе ранее идентифицированных организмов. Предоставляемые производителями приборов базы данных на данный момент не содержат референсных спектров для вредителей и паразитов растений, однако программное обеспечение приборов, как правило, позволяет интегрировать свои собственные референсные спектры в существующие базы данных и впоследствии осуществлять автоматизированное сравнение (Murugaiyan, Roesler, 2017). Для создания референсных спектров надо использовать образцы, видовая принадлежность которых установлена, например, при помощи морфологических методов.

Одним из важных преимуществ MALDI-TOF MS по сравнению с другими методами идентификации является быстрое время пробоподготовки и проведения испытания (Murugaiyan, Roesler, 2017). Для идентификации достаточно одной особи, из которой предварительно должен быть выделен белковый экстракт при помощи 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрила, или клещ может быть напрямую расположен на металлической мишени прибора, куда добавляется муравьиная кислота и ацетонитрил, а затем и матричный раствор (Kajiwar et al., 2016). Главный недостаток метода – высокая стоимость прибора, но при этом цена одного анализа весьма низкая и складывается из стоимости матричного раствора и калибровочного стандарта (при условии многоразовой стальной плашки для образцов).

Н. Kajiwar et al. (Kajiwar et al., 2016) показали, что близкородственные виды паутиных клещей рода *Tetranychus* (см. таблицу) демонстрируют различные масс-спектры, позволяющие их идентифицировать. Видовая идентификация выполнялась путем сравнения трех основных спектральных пиков в диапазоне m/z от 2000 до 10000, соответствующих рибосомальным белкам. У взрослых особей обоих полов все три пика дифференцировались, что позволило отнести их к одному виду. В случае клещей на стадии нимфы можно было идентифицировать только два пика из трех основных. Минорные пики были специфичными к полу или к стадии развития и для идентификации не применялись (Kajiwar et al., 2016).

В целом MALDI-TOF MS является перспективным методом идентификации паутиных клещей, но его применение пока ограничено и требует дальнейших исследований. В частности, возможно наличие спектральных различий между географически разными популяциями, что было показано для некоторых насекомых (Murugaiyan, Roesler,

2017) и ссылки в статье). Предполагается также, что на спектры одного вида может оказывать влияние растение, на котором питался клещ (Kajiwar et al., 2016).

Молекулярные методы

Наряду с биохимическими применяют молекулярные методы на основе последовательности ДНК. Участки ДНК, амплифицированные методом ПЦР, могут служить биологическими штрихкодами для определения вида, к которому принадлежит образец (Hajibabaei et al., 2007). В качестве таких штрихкодов выступают последовательности ядерного и митохондриального генома. В пределах кластера рибосомной ДНК чередуются более и менее консервативные участки (гены 18S, 5.8S, 28S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры 1, 2 (ITS1, ITS2) соответственно), что дает возможность подбирать различные маркерные последовательности для разделения таксонов разного ранга. Последовательности генов 18S и 28S рДНК используются для сравнения филогенетически удаленных таксонов (Matsuda et al., 2014), а области ITS эффективны для различения видов и даже популяций (Hillis, Dixon, 1991; Hurtado et al., 2008). Среди митохондриальных генов для идентификации видов и анализа филогенетических взаимоотношений применяется последовательность гена субъединицы I цитохром-с оксидазы (*COI*). Помимо фрагмента Фолмера (Barcode of life, BOLD, Folmer et al., 1994), который является 5'-концевой последовательностью гена *COI*, в целях штрихкодирования паутиных клещей используют и другие последовательности гена (Hinamoto et al., 2007; Ros, Breeuwer, 2007; Matsuda et al., 2013; Inak et al., 2022).

В статье (Ben-David et al., 2007) авторы применяли последовательность ITS2 в качестве штрихкода, с помощью которого различили 16 видов паутиных клещей семейства Tetranychidae, обитающих в Израиле (см. таблицу). Последовательность штрихкода каждого вида была однозначно отличима от всех других (Ben-David et al., 2007). Эффективность штрихкодов для видовой идентификации была также подтверждена в ходе определения видов паутиных клещей, собранных на сельскохозяйственных полях во Вьетнаме, с использованием фрагмента гена *COI* (Hinamoto et al., 2007) (см. таблицу).

Результаты показали и ограничения: некоторые образцы не могли быть классифицированы из-за отсутствия информации о последовательности в базах данных, другие виды невозможно было однозначно идентифицировать по последовательности ДНК, например *T. urticae* и *T. turkestanii*, *T. neocaledonicus* и *T. gloveryi*. Данные о невозможности разделения на основе последовательности гена *COI* *T. urticae* и *T. turkestanii* подтверждены также на клещах, собранных в разных регионах России и Турции (Коноплев и др., 2017; Inak et al., 2022). Эти ограничения могут быть преодолены путем дальнейшего накопления данных о последовательностях различных участков ДНК из морфологически идентифицированных образцов. Т. Matsuda et al. (Matsuda et al., 2013) идентифицировали виды клещей рода *Tetranychus*, определяя последовательности ITS и гена *COI*. Авторы пришли к выводу, что 10 из 13 видов японских клещей рода *Tetranychus* могут быть дифференцированы с помощью последовательности ITS,

Перечень разработанных систем для идентификации видов паутиных клещей

Метод идентификации		Аллозимный анализ				MALDI-TOF MS	Штрихкодирование				ПЦР-ПДРФ				Видоспецифичные праймеры				TaqMan ПЦР	LAMP			
Род	Вид	Osakabe, 1987	Gotoh, 1992	Gotoh et al., 2007	Arabuli et al., 2019	Kajiwara et al., 2016	Ben-David et al., 2007	Hinomoto et al., 2007	Matsuda et al., 2012	Matsuda et al., 2013	Arabuli et al., 2019	Osakabe et al., 2008	Arimoto et al., 2013	Hurtado et al., 2008	Ovalle et al., 2020	Khaing et al., 2015	Shim et al., 2016	Zélé et al., 2018	Sinaie et al., 2018	Li et al., 2015	Chen et al., 2020	Sinaie et al., 2019	
Tetranychus	urticae			+		+	+	+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	
	ludeni			+		+	+			+		+	+	+					+			+	
	kanzawai			+		+		+		+		+	+					+					
	phaselus			+		+				+		+	+					+					
	evansi					+	+			+			+	+	+				+				
	truncatus			+				+		+		+	+				+						
	piercei			+						+		+	+										
	okinawanus			+						+		+	+										
	turkestani						+						+	+	+					+			
	pueraricola			+						+		+											
	parakanzawai			+						+		+											
	ezoensis			+						+		+											
	neocaledonicus			+						+			+										
	takafujii			+								+											
	lambi												+	+							+		
	malaysiensis													+									
	pacificus													+									
	merganser													+									
	misumaiensis									+													
Panonychus	citri	+					+		+					+		+							
	ulmi		+				+									+							
	mori	+							+							+							
	thelytokus		+													+							
	bambusicola		+																				
	caglei															+							
Oligonychus	osmanthi								+														
	coffae								+	+													
	gotohi								+	+													
	perseae						+																
	afraziaticus						+																
	mangiferus						+																
	clavatus								+														
	pustulosus								+														
	karamatus								+														
	hondoensis								+														
	tsudomei								+														
	ilicis								+														
	camelliae								+														
	ununguis								+														
	perditus								+														
	castaneae								+														
	amiensis								+														
	orthius								+														
	modestus								+														
	biharensis								+														
rubicundus								+															
Mononychellus	caribbeanae														+								
	mcgregori														+								
	tanajoa														+								
Amphitettranychus	viennensis				+						+												
	quercivorus				+						+												
	savencoae				+						+												
Schizotetranychus	asparagi					+																	
Eutetranychus	palmatus						+																
	orientalis						+																

Примечание. Знак «+» обозначает вид, присутствующий в системе. MALDI-TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционного фрагмента; LAMP – петлевая изотермическая амплификация.

а последовательность гена *COI* позволяет определить все 13 видов (см. таблицу).

В отличие от рода *Tetranychus*, где некоторые виды невозможно различить на основе последовательностей ДНК, для рода *Oligonychus* данный метод показал свою эффективность (Matsuda et al., 2012). Авторы сообщили, что при помощи любой из последовательностей – гена *COI*, ITS и 28S рДНК – можно разделить все 17 японских видов, включая те, которые сложно дифференцировать по морфологическим признакам, такие как *O. castaneae* и *O. coffeae* (см. таблицу). Молекулярный анализ последовательности гена *COI* клещей рода *Amphitetranynchus* показал, что она эффективна для идентификации всех трех видов (Arabuli et al., 2019) (см. таблицу).

Таким образом, метод штрихкодирования является эффективным инструментом для видовой идентификации отдельных родов паутиных клещей, таких как *Oligonychus*, *Amphitetranynchus*. Некоторые близкородственные виды (например, из рода *Tetranychus*) могут быть неотличимы друг от друга по последовательностям штрихкодов, как это показано для видов *T. kanzawai*, *T. parakanzawai* и *T. ezoensis*, которые неотличимы по последовательности ITS (Matsuda et al., 2013), и видов *T. urticae* и *T. turkestanii*, не различающихся по последовательности гена *COI* (Hinomoto et al., 2007; Коноплёв и др., 2017). Для таких видов нужно подбирать другие маркерные гены.

Стремление к уменьшению времени на анализ привело к развитию более быстрых методов идентификации паутиных клещей. Одним из таких является **полиморфизм длины рестрикционного фрагмента после ПЦР** (ПЦР-ПДРФ, PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP). Суть его заключается в том, что участки геномной ДНК (ядерной или митохондриальной), амплифицированные методом ПЦР, подвергаются гидролизу эндонуклеазами рестрикции. Продукты рестрикции в дальнейшем анализируются при помощи гель-электрофореза, и на основе этого делается вывод о наличии или отсутствии сайта рестрикции у данного образца и, как следствие, о видовой принадлежности.

ПЦР-ПДРФ широко применяется для идентификации видов различных организмов (Ratcliffe et al., 2003; Han et al., 2004; Alam et al., 2007). К паутиным клещам метод ПДРФ был впервые применен для различения трех видов рода *Panonychus* и *T. urticae* (Osakabe, Sakagami, 1994) (см. таблицу). Позже удалось дифференцировать *T. urticae* и *T. pueraricola* с помощью ПЦР-ПДРФ, используя область ITS2 (Gotoh et al., 1998). В исследовании (Hurtado et al., 2008) авторы разработали систему ПЦР-ПДРФ фрагмента ITS (ITS1, 5.8S рДНК, ITS2) для идентификации пяти видов паутиных клещей, которые обитают в цитрусовых садах Испании (см. таблицу). При этом самым вредоносным из них является обыкновенный паутинный клещ (*T. urticae*), что делает необходимым быстрое выявление его среди других видов. Паттерн фрагментов рестрикции ферментом *RsaI* отделял *T. urticae* от остальных изучаемых видов, а гидролиз двумя другими ферментами позволял определить остальные четыре вида (Hurtado et al., 2008). Метод ПЦР-ПДРФ на основе ITS областей используется в японском отделе карантина импортных растений (Arimoto et al., 2013; Li et al., 2015) и позволяет определять все

14 видов паутиных клещей, встречающихся в Японии, в том числе пять экзотических видов (Osakabe et al., 2002, 2008; Arimoto et al., 2013) (см. таблицу). ПЦР-ПДРФ в области *COI* успешно использован для идентификации четырех видов паутиных клещей, обитающих на маниоке в Колумбии (Ovalle et al., 2020) (см. таблицу).

ПЦР-ПДРФ – относительно недорогой и эффективный метод диагностики паутиных клещей, применяемый во многих странах по всему миру (Hurtado et al., 2008; Arimoto et al., 2013; Ovalle et al., 2020). Однако он может быть применен только для тех видов, для которых данная методика была отработана, например, для идентификации клещей на территории, видовой состав которой хорошо установлен. При добавлении в систему новых видов надо анализировать их ПДРФ-паттерн, и в случае совпадения паттерна с уже имеющимися систему следует модифицировать, подбирая другие диагностические рестриктазы. Также возможна вариабельность паттерна ПДРФ среди разных популяций одного и того же вида, которая связана с нуклеотидными заменами в сайте рестрикции (Arimoto et al., 2013).

Другой подход для быстрой идентификации клещей – подбор **видоспецифичных праймеров**. Области ДНК, в которых определены праймеры, должны быть общими для определяемых видов, но сами последовательности должны различаться между видами одного рода (Shim et al., 2016). При этом могут быть использованы как целые пары видоспецифичных праймеров, так и пары, в которых один праймер универсальный, а второй – уникальный для конкретного вида. Такие праймеры повышают точность и скорость определения видов паутиных клещей на основе ПЦР, но их разработка является нетривиальной задачей. Т.М. Khaing с коллегами (Khaing et al., 2014) удалось подобрать пары видоспецифичных праймеров к области ITS2 для четырех видов паутиных клещей, относящихся к роду *Panonychus* (см. таблицу). Позже были разработаны видоспецифичные праймеры для паутиных клещей рода *Tetranychus* (см. таблицу), распространенных в Корее и морфологически очень схожих (Shim et al., 2016).

Объединение нескольких видоспецифичных праймеров в одной пробирке позволяет применить **мультиплексный подход** для определения сразу нескольких видов. При этом температура плавления праймеров должна быть высокой, а образующиеся ампликоны короткими, но разными по длине. Для проведения мультиплексной ПЦР необходим подбор условий амплификации, таких как соотношение пар праймеров и время элонгации (Zélé et al., 2018). F. Zélé с соавторами (Zélé et al., 2018) разработали и успешно мультиплексировали в одной реакции праймеры, комплементарные рибосомному локусу, для идентификации наиболее распространенных паутиных клещей, встречающихся в Юго-Западной Европе (см. таблицу). Мультиплексная ПЦР также была использована для дискриминации двух основных видов паутиных клещей, встречающихся в тепличных хозяйствах Ирана, – *T. urticae* и *T. turkestanii* (Sinaie et al., 2018).

Применение для видовой идентификации **ПЦР в реальном времени** позволяет сократить время на анализ за счет отсутствия необходимости в проведении гель-электрофореза, поскольку накопление ПЦР-продукта

отслеживается непосредственно во время реакции при помощи оптических датчиков, вмонтированных в амплификатор. Для детекции ПЦР-продукта используют два типа меток: интеркалирующие агенты (например, SYBR Green) или модифицированные олигонуклеотиды, содержащие флуорофоры (ДНК-зонды) (Бикбулатова и др., 2012). Кроме того, ПЦР-анализ в реальном времени сочетает этапы отжига праймеров и элонгации, что приводит к более короткому времени реакции, чем в случае обычной ПЦР (Li et al., 2015).

D. Li с коллегами (Li et al., 2015) разработали систему детекции *T. urticae* среди других близкородственных видов при помощи TaqMan ПЦР, которая оказалась высоко-специфичной и надежной. TaqMan – один из вариантов гибридизационных ДНК-зондов, олигонуклеотид, комплементарный внутреннему участку амплифицируемого фрагмента ДНК, меченный по концам флуорофорами – репортером и гасителем. Когда они находятся на одном зонде, гаситель поглощает сигнал от репортера. Во время амплификации движущаяся по ДНК полимераз разрушает зонд, репортер и гаситель отдаляются друг от друга, и флуоресценция репортера становится заметной (Бикбулатова и др., 2012). Видоспецифичные праймеры и зонд были подобраны к последовательности ITS1 *T. urticae*, поскольку у *T. urticae* она содержала больше внутривидовых полиморфизмов, чем широко применяемая для филогении и идентификации видов *Tetranychus* последовательность ITS2 (Li et al., 2015).

Другой коллектив авторов (Chen et al., 2020) предложил видоспецифичные зонды TaqMan для идентификации паутинных клещей, обитающих на хлопковых полях Австралии (см. таблицу), и подобрал условия их использования в одной пробирке (мультиплексный подход). Важной особенностью такого подхода является возможность его распространения при незначительной модификации на другие виды паутинных клещей. Поскольку для амплификации применяется универсальная для паутинных клещей пара праймеров, при добавлении в тест-систему еще одного вида нужно разработать и добавить для него видоспецифичный зонд и подобрать условия реакции (Chen et al., 2020). Авторы использовали в одной реакции ДНК-зонды для трех видов клещей и считают, что можно увеличить их количество до пяти (добавить или заменить на ДНК-зонды для необходимых видов), что позволит диагностировать до пяти различных видов клещей в рамках одной ПЦР.

Еще один метод, который может быть применен для целей идентификации видов, это **петлевая изотермическая амплификация** (loop mediated isothermal amplification, LAMP) (Tomita et al., 2008). В отличие от классической ПЦР, в петлевой изотермической амплификации используется другая термостабильная полимераз с высокой вытесняющей способностью, которая может сама вытеснять вторую цепь без термической денатурации. Поэтому реакция LAMP проходит при одной и той же температуре (60–65 °C) и не требует наличия амплификатора. Другой особенностью LAMP является то, что в ходе реакции используются не два, а четыре или шесть праймеров, что определяет ее большую специфичность (Notomi et al., 2000). Однако подбор праймеров для LAMP представляет

собой довольно трудоемкую задачу. Детекцию продукта реакции изотермической амплификации возможно проводить несколькими способами, в том числе невооруженным глазом при помощи добавления флуоресцентного красителя, который будет флуоресцировать в случае прохождения реакции (Tomita et al., 2008). Таким образом, метод не только не требует специального оборудования или специально обученных специалистов, но и подходит для крупномасштабных полевых исследований (Hsieh et al., 2012; Sinaie et al., 2019).

Как хорошо зарекомендовавший себя метод, LAMP имеет широкий спектр применений, в том числе для идентификации возбудителей болезней растений, видов насекомых (Ahuja, Somvanshi, 2021; Dermauw et al., 2022). Применительно к диагностике обыкновенного паутинного клеща был разработан высокочувствительный метод, объединяющий ПЦР и LAMP (ПЦР-LAMP) (Sinaie et al., 2019). Перед выполнением изотермической амплификации выполнялась стандартная ПЦР, что позволяло уменьшить долю ложноотрицательных результатов и увеличить чувствительность анализа LAMP. Авторы показали, что ПЦР-LAMP является быстрым и надежным методом обнаружения биоматериала *T. urticae*.

Заключение

Обзор существующих в настоящее время методов диагностики особо значимых по вредоносности видов растительных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae) показал, что накоплено большое разнообразие подходов, которые можно применять по выбору в зависимости от целей видовой диагностики. Морфологические методы, несмотря на трудоемкость выполнения предварительных операций по подготовке клещей для анализа, до сих пор остаются основными в определении этой группы фитофагов. Однако разрабатываемые в последние десятилетия новые подходы в области видовой диагностики живых организмов, основанные на биохимических и молекулярных маркерах, открывают еще большие возможности для быстрой и точной идентификации видов. Так, видовая принадлежность некоторых видов паутинных клещей, например *T. urticae*, с уверенностью может быть установлена при помощи одного из молекулярных подходов (штрихкодирование, ПЦР-ПДРФ, TaqMan ПЦР и др.). В то же время некоторые другие виды на данный момент не удалось диагностировать на основе последовательностей ДНК. В таких случаях оправдано применение сразу нескольких методов идентификации. Комплексный подход использовался для диагностики видов рода *Amphitetranynchus* (Arabuli et al., 2019), где морфологическая характеристика была дополнена биохимическими, молекулярными методами и экспериментами по скрещиванию. Важно отметить, что несколько подходов могут быть реализованы на одной и той же особи при условии использования методов выделения ДНК без разрушения образца (Khaing et al., 2013; Shim et al., 2016) либо использования целого клеща в качестве матрицы для ПЦР (direct PCR) (Sakamoto, Gotoh, 2017) и последующей проверки морфологических признаков. После данных манипуляций образцы сохраняют неповрежденные морфологические признаки, включая спинные щетинки и эдеагус (Sakamoto, Gotoh, 2017).

Список литературы / References

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003.
[Altukhov Yu.P. Genetic Processes in Populations. Moscow: Akademkniga Publ., 2003. (in Russian)]
- Ахатов А.К. Практическое пособие по идентификации клещей и насекомых в овощных теплицах. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2016.
[Akhmatov A.K. Guide to the Identification of Acarids and Insects in Vegetable Greenhouses. Moscow: KMK Publ., 2016. (in Russian)]
- Балыкина Е.Б., Ягодинская Л.П., Рыбарева Т.С., Балицкий Н.В. Влияние акарицидов на изменение структуры акарокомплекса клещей-фитофагов. *Бюл. Гос. Никитского ботан. сада*. 2017; 123:58-64.
[Balykina E.B., Yagodinskaya L.P., Rybareva T.S., Balitsky N.V. Influence of acarocides on the structure of a phytovorous acarid complex. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the Nikita Botanical Garden*. 2017;123:58-64. (in Russian)]
- Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной реакции в режиме реального времени. *Вестн. Башк. ун-та*. 2012;17(1):59-67.
[Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Methods for detecting polymerase chain reaction in real-time mode. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta = Herald of the Bashkir State University*. 2012;17(1):59-67. (in Russian)]
- Волкова М.В., Матвейкина Е.А. Структурные изменения в комплексе растительноядных клещей на промышленных виноградниках Крыма. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2016;38(2):130-139.
[Volkova M.V., Matveikina E.A. Structural changes in the phytophagous mite complex in the commercial vineyards of the Crimea. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2016;38(2):130-139. (in Russian)]
- Зейналов А.С. Экологические и фитосанитарные последствия изменения климата в насаждениях плодовых культур. *Ученые со-врем. науки*. 2017;2(9):94-100.
[Zeynalov A.S. Ecological and phytosanitary consequences of climate change in the plantings of fruit cultures. *Uspekhi Sovremennoy Nauki = Modern Science Success*. 2017;2(9):94-100. (in Russian)]
- Зейналов А.С., Орел Д.С. Изменение видового состава, биоэкологии и вредоносности основных фитофагов яблони в Центральном районе Нечерноземной зоны России под влиянием климатических факторов. *Вестн. КазГАСУ*. 2021;16(1):15-21. DOI 10.12737/2073-0462-2021-15-21.
[Zeynalov A.S., Orel D.S. Change in species composition, bioecology and harmfulness of main applian phytophages in the Central Region of the Non-Black Earth Zone of Russia under the influence of climate factors. *Vestnik Kazanskogo GAU = Vestnik of the Kazan State Agrarian University*. 2021;16(1):15-21. DOI 10.12737/2073-0462-2021-15-21. (in Russian)]
- Камаев И.О. Паутиные клещи рода *Oligonychus* (Acari: Tetranychidae), встречающиеся на посадочном материале хвойных растений. В: X Чтения памяти О.А. Катаева. Дендробионтные беспозвоночные животные и грибы и их роль в лесных экосистемах. Т. 1. Насекомые и прочие беспозвоночные животные: Материалы междунар. конф. С.-Петербург, 22–25 окт. 2018 г. СПб., 2018;44.
[Kamayev I.O. *Oligonychus* (Acari: Tetranychidae) mites occurring in conifer planting material. In: Lectures in memoriam O.A. Kataev. Dendrobiont Invertebrates and Fungi and Their Role in Forest Ecosystems. Vol. 1. Insects and other invertebrates. Proceed. of the int. conf. St. Petersburg, Oct. 22–25, 2018. St. Petersburg, 2018;44. (in Russian)]
- Камаев И.О. Подходы к диагностике паутиных клещей (Acari: Tetranychidae) в фитосанитарной практике. В: Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике. Материалы Второй Всерос. конф. с междунар. участием. Москва, 22–26 апр. 2019 г. М.; Красноярск, 2019;82.
[Kamayev I.O. Approach to diagnostics of spider mites (Acari: Tetranychidae) in phytosanitary practice. In: Monitoring and Biological Control Methods of Woody Plant Pests and Pathogens: From theory to practice. Proceed. of Second int. conf. Moscow, April 22–26, 2019. Moscow; Krasnoyarsk, 2019;82. (in Russian)]
- Камаев И.О., Карпун Н.Н. Новые сведения о паутиных клещах (Acari: Trombidiformes: Tetranychidae), населяющих декоративные растения Черноморского побережья Краснодарского края, Россия. *Кавк. энтомол. бюл.* 2020;16(2):295-298. DOI 10.23885/181433262020162-295298.
[Kamayev I.O., Karpun N.N. A new data on spider mites (Acari: Trombidiformes: Tetranychidae) inhabiting ornamental plants on the Black Sea coast of Krasnodar Region, Russia. *Kavkazskiy Entomologicheskii Byulleten = Caucasian Entomological Bulletin*. 2020;16(2):295-298. DOI 10.23885/181433262020162-295298. (in Russian)]
- Камаев И.О., Миронова М.К. Фитосанитарный риск растительноядных клещей (Arachnida: Acariformes). *Карантин растений. Наука и практика*. 2018;3(25):13-20.
[Kamayev I.O., Mironova M.K. The phytosanitary risk of herbivorous mites (Arachnida: Acariformes). *Karantin Rasteniy. Nauka i Praktika = Plant Quarantine: Science and Policy*. 2018;3(25):13-20. (in Russian)]
- Коноплев Н.Д., Игнатов А.Н., Попов С.Я. К вопросу о возможности видовой диагностики *Tetranychus urticae* и *T. atlanticus* (Acari: Tetranychidae) с использованием мт-гена COI. *Вестн. защиты растений*. 2017;4(94):43-47.
[Konoplev N.D., Ignatov A.N., Popov S.Ya. To question of opportunity of *Tetranychus urticae* and *T. atlanticus* (Acari: Tetranychidae) identification using mtDNA COI gene. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2017;4(94):43-47. (in Russian)]
- Кошкин Е.И., Андреева И.В., Гусейнов Г.Г., Гусенов К.Г., Джалилов Ф.С.-У., Митюшев И.М. Особенности взаимодействия растений и фитофагов в агроценозах при изменении климата. *Агрохимия*. 2021;1:79-96. DOI 10.31857/S0002188121010063.
[Koshkin E.I., Andreeva I.V., Guseinov G.G., Guseinov K.G., Dzhaliylov F.S.-U., Mityushev I.M. Specific aspects of the plant and phytophage interactions in agroecosystems under climate change. *Agrokhimiya = Agrochemistry*. 2021;1:79-96. DOI 10.31857/S0002188121010063. (in Russian)]
- Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017.
[Kutlunina N.A., Ermoshin A.A. Molecular Methods in Plant Studies. Yekaterinburg: Urals State Univ. Publ., 2017. (in Russian)]
- Митрофанов В.И., Стрункова З.И., Лившиц И.З. Определитель тетраниховых клещей фауны СССР и сопредельных стран. Душанбе: Дониш, 1987.
[Mitrofanov V.I., Strunkova Z.I., Livshits I.Z. Guide to Spider Mites in the Fauna of the USSR and Neighboring Countries. Dushanbe: Donish Publ., 1987. (in Russian)]
- Мусолин Д.Л., Саулич А.Х. Реакции насекомых на современное изменение климата: от физиологии и поведения до смещения ареалов. *Энтомол. обозрение*. 2012;91(1):3-35.
[Musolin D.L., Saulich A.K. Responses of insects to the current climate changes: from physiology and behavior to range shifts. *Entomological Review*. 2012;92(7):715-740. DOI 10.1134/S0013873812070019.]
- Петров Д.Л., Жоров Д.Г., Сауткин Ф.В. Галловый клещ *Aceria erinea* (Nalepa, 1891) (Acariformes: Eriophyidae) – новый инвазивный вид фитофагов грецкого ореха (*Juglans regia* L.) в Беларуси. *Вестн. БГУ*. 2016;2:75-77.

- [Petrov D.L., Zhorov D.G., Sautkin F.V. Leaf gall mite *Aceria erinea* (Nalepa, 1891) (Acari: Eriophyidae) – a new invasive species of pests of walnut (*Juglans regia* L.) in Belarus. *Vestnik Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta* = *Vestnik BGU*. 2016;2:75-77. (in Russian)]
- Попов С.Я. Экологические аспекты ограничения вредоносности популяций насекомых и клещей. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2013. [Popov S.Ya. The Ecological Aspect of Controlling the Harm of Insect and Mite Populations: A collection of articles. Moscow: RGAU-MSKhA Publ., 2013. (in Russian)]
- Рак Н.С., Литвинова С.В. Миграция и акклиматизация вредных организмов при интродукции растений в оранжереях Крайнего Севера России. *Hortus Botanicus*. 2010;5:2. [Rak N.S., Litvinova S.V. Hazardous organisms migration and acclimatization during the plant introduction in the Far North Russia greenhouses. *Hortus Botanicus*. 2010;5:2. (in Russian)]
- Ahmad F., Babalola O.O., Tak H.I. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;40(4):1247-1255. DOI 10.1007/s00216-012-6091-7.
- Ahuja A., Somvanshi V.S. Diagnosis of plant-parasitic nematodes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a review. *Crop Prot.* 2021;147:105459. DOI 10.1016/j.cropro.2020.105459.
- Alam M.T., Das M.K., Dev V., Ansari M.A., Sharma Y.D. PCR-RFLP method for the identification of four members of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007;101(3):239-244. DOI 10.1016/j.trstmh.2006.03.007.
- Arabuli T., Negm M.W., Matsuda T., Kitashima Y., Abramishvili T., Akimov I.A., Zhovnerchuk O.V., Popov S.Ya., Gotoh T. Morphological identification of *Amphitetranychus* species (Acari: Tetranychidae) with crossbreeding, esterase zymograms and DNA barcode data. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221951. DOI 10.1371/journal.pone.0221951.
- Arimoto M., Satoh M., Uesugi R., Osakabe M. PCR-RFLP analysis for identification of *Tetranychus* spider mite species (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2013;106(2):661-668. DOI 10.1603/EC12440.
- Ben-David T., Melamed S., Gerson U., Morin S. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 2007;41(3):169-181. DOI 10.1007/s10493-007-9058-1.
- Chaires-Grijalva M.P., Serrano-Domínguez A.K., Coronado-Blanco J.M. Mites associated with maize in Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2021;12(8):1497-1510. DOI 10.29312/remexca.v12i8.2718.
- Chen Y., Woolley L., Nguyen D., Gupta R., Chandler G.T., Nehl D., Herron G.A. Development and use of a single real-time PCR assay to identify the three spider mite species *Tetranychus urticae*, *Tetranychus lambi* and *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae). *Austral. Entomol.* 2020;59(3):630-638. DOI 10.1111/aen.12457.
- Dermauw W., Moerkercke Y.V., Ebrahimi N., Casteels H., Bonte J., Witters J. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of *Ceratitidis capitata* and related species. *Curr. Res. Insect Sci.* 2022;2:100029. DOI 10.1016/j.cris.2022.100029.
- Devi M., Challa N., Mahesh G. Important mite pests of temperate and sub-tropical crops: a review. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2019;7(4):1378-1384.
- Enohara K., Amano H. Simple method for discriminating six common species of red *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 1996;40(4):311-315. DOI 10.1303/jjaez.40.311. (in Japanese)
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994;3(5):294-299.
- Goka K., Takafuji A. Electrophoretic detection of enzyme variation among Japanese red-coloured spider mites of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 1998;22:167-176. DOI 10.1023/A:1006006129339.
- Gotoh T. Separation of *Panonychus ulmi*, *P. thelytokus* and *P. bambusicola* (Acari: Tetranychidae) by esterase zymograms. *Appl. Entomol. Zool.* 1992;27(4):598-601. DOI 10.1303/aez.27.598.
- Gotoh T., Gutierrez J., Navajas M. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Sci.* 1998;1(1):55-57.
- Gotoh T., Kitashima Y., Adachi I. Geographic variation of esterase and malate dehydrogenases in two spider mite species, *Panonychus osmanthi* and *P. citri* (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Int. J. Acarol.* 2004;30(1):45-54. DOI 10.1080/01647950408684368.
- Gotoh T., Kitashima Y., Goka K. Tetranychus mite species identification using esterase and phosphoglucosylase zymograms. *Appl. Entomol. Zool.* 2007;42(4):579-585. DOI 10.1303/aez.2007.579.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N., Hickey D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 2007;23(4):167-172. DOI 10.1016/j.tig.2007.02.001.
- Han H., Cho M.R., Jeon H.Y., Lim C.K., Jang H.I. PCR-RFLP identification of three major *Meloidogyne* species in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 2004;7(2):171-175. DOI 10.1016/S1226-8615(08)60212-5.
- Hillis D.M., Dixon M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 1991;66(4):411-453. DOI 10.1086/417338.
- Hinomoto N., Tran D.P., Pham A.T., Le T.B.N., Tajima R., Ohashi K., Osakabe M., Takafuji A. Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in Northern Vietnam. *Int. J. Acarol.* 2007;33(1):53-60. DOI 10.1080/01647950708684501.
- Hsieh C.-H., Wang H.-Y., Chen Y.-F., Ko C.-C. Loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of biotypes B and Q of the globally invasive pest *Bemisia tabaci*, and studying population dynamics. *Pest Manag. Sci.* 2012;68(8):1206-1213. DOI 10.1002/ps.3298.
- Hurtado M.A., Ansaloni T., Cros-Arteil S., Jacas J.A., Navajas M. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Ann. Appl. Biol.* 2008;153(2):167-174. DOI 10.1111/j.1744-7348.2008.00250.x.
- İnak E., Çobanoğlu S., Auger P., Migeon A. Molecular identification and phylogenetic analysis of spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) of Turkey. *Exp. Appl. Acarol.* 2022;87:195-205. DOI 10.1007/s10493-022-00728-5.
- Kajiwa H., Hinomoto N., Gotoh T. Mass fingerprint analysis of spider mites (Acari) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid discrimination. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2016;30(8):1037-1042. DOI 10.1002/rcm.7534.
- Khaing T.M., Lee J.-H., Lee W.-G., Lee K.-Y. A new record of *Amphitetranychus quercivorus* (Acari: Tetranychidae) in Korea and molecular comparison with *A. viennensis*. *J. Asia Pac. Entomol.* 2013;16(2):155-160. DOI 10.1016/j.aspen.2012.12.003.
- Khaing T.M., Shim J.-K., Lee K.-Y. Molecular identification and phylogenetic analysis of economically important acaroid mites (Acari: Astigmata: Acaroidea) in Korea. *Entomol. Res.* 2014;44(6):331-337. DOI 10.1111/1748-5967.12085.
- Khaing T.M., Shim J.-K., Lee K.-Y. Molecular identification of four *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae) in Korea, including new records of *P. caglei* and *P. mori*. *Entomol. Res.* 2015;45:345-353. DOI 10.1111/1748-5967.12135.
- Lampo M., Rangel Y., Mata A. Genetic markers for the identification of two tick species, *Amblyomma dissimile* and *Amblyomma rotundatum*. *J. Parasitol.* 1997;83(3):382-386. DOI 10.2307/3284398.
- Li D., Fan Q.-H., Waite D.W., Gunawardana D., George S., Kumarsinghe L. Development and validation of a real-time PCR assay for rapid detection of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *PLoS One*. 2015;10(7):e0131887. DOI 10.1371/journal.pone.0131887.

- Matsuda T., Fukumoto C., Hinomoto N., Gotoh T. DNA-based identification of spider mites: molecular evidence for cryptic species of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2013;106(1):463-472. DOI 10.1603/EC12328.
- Matsuda T., Hinomoto N., Singh R.N., Gotoh T. Molecular-based identification and phylogeny of *Oligonychus* species (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2012;105(3):1043-1050. DOI 10.1603/EC11404.
- Migeon A., Morishita M., Hinomoto N., Gotoh T. Phylogenetic analysis of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) based on the mitochondrial COI gene and the 18S and the 5' end of the 28S rRNA genes indicates that several genera are polyphyletic. *PLoS One.* 2014;9(10):e108672. DOI 10.1371/journal.pone.0108672.
- Migeon A., Nouguié E., Dorkeld F. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. In: Sabelis M., Bruin J. (Eds.) *Trends in Acarology*. Dordrecht: Springer, 2010;557-560. DOI 10.1007/978-90-481-9837-5_96.
- Morphological Identification of Spider Mites (Tetranychidae) Affecting Imported Fruits. The Secretariat of the North American Plant Protection Organization, Canada, 2014.
- Murugaiyan J., Roesler U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017;7:184. DOI 10.3389/fcimb.2017.00184.
- Navajas M., Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.* 2000;24(10-11):751-774. DOI 10.1023/a:1006497906793.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):e63. DOI 10.1093/nar/28.12.e63.
- Obasa K., Alabi O.J., Sétamou M. Wheat curl mite: a new source of the Eriophyoid mite in wheat fields identified. *PhytoFrontiers.* 2022;2(4):342-346. DOI 10.1094/PHYTOFR-04-22-0038-SC.
- Osakabe Mh. Difference of esterase isozymes between non-diapausing and diapausing strains of the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 1987;22(4):577-584. DOI 10.1303/aez.22.577.
- Osakabe Mh., Hirose T., Satō M. Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl. Entomol. Zool.* 2002;37(3):399-407. DOI 10.1303/aez.2002.399.
- Osakabe Mh., Kotsubo Yu., Tajima R., Hinomoto N. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2008;101(4):1167-1175. DOI 10.1093/jee/101.4.1167.
- Osakabe Mh., Sakagami Y. RFLP analysis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite, genus *Panonychus* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biol.* 1994;3(1):63-66. DOI 10.1111/j.1365-2583.1994.tb00152.x.
- Ovalle T.M., Vásquez-Ordóñez A.A., Jimenez J., Parsa S., Cuellar W.J., Lopez-Lavalle L.A.B. A simple PCR-based method for the rapid and accurate identification of spider mites (Tetranychidae) on cassava. *Sci. Rep.* 2020;10(1):19496. DOI 10.1038/s41598-020-75743-w.
- Ratcliffe S.T., Webb D.W., Weinzievr R.A., Robertson H.M. PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) – a generally applicable method. *J. Forensic Sci.* 2003;48(4):783-785. DOI 10.1520/JFS2002136.
- Ros V.I.D., Breeuwer J.A.J. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp. Appl. Acarol.* 2007;42(4):239-262. DOI 10.1007/s10493-007-9092-z.
- Sakamoto H., Gotoh T. Non-destructive direct polymerase chain reaction (direct PCR) greatly facilitates molecular identification of spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 2017;52:661-665. DOI 10.1007/s13355-017-0512-1.
- Shim J.-K., Khaing T.M., Seo H.-E., Ahn J.-Y., Jung D.-O., Lee J.-H., Lee K.-Y. Development of species-specific primers for rapid diagnosis of *Tetranychus urticae*, *T. kanzawai*, *T. phaseolus* and *T. truncatus* (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Res.* 2016;46(2):162-169. DOI 10.1111/1748-5967.12154.
- Sinaie S., Sadeghi Namaghi H., Fekrat L. A multiplex PCR assay for simultaneous discrimination of two predominant spider mites of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) in greenhouses of Iran. *J. Agr. Sci. Tech.* 2018;20(4):733-744.
- Sinaie S., Sadeghi-Namaghi H., Fekrat L. Loop-mediated isothermal amplification combined with PCR for specific identification of injurious mite, *Tetranychus urticae* (Trombidiformes: Tetranychidae). *Biologia.* 2019;74(5):477-485. DOI 10.2478/s11756-018-00187-7.
- Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 2015;6:791. DOI 10.3389/fmicb.2015.00791.
- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008;3(5):877-882. DOI 10.1038/nprot.2008.57.
- Turak E., Hales D.F. An allozyme method for identifying individual aphids of morphologically similar taxa (Hemiptera: Aphididae). *J. Aust. Ent. Soc.* 1994;33(1):57-59. DOI 10.1111/j.1440-6055.1994.tb00920.x.
- Ulyanova E., Andreeva I., Shatalova E. The species composition of herbivorous acarofauna in the south of Western Siberia. *Persian J. Acarol.* 2022;11(2):365-370. DOI 10.22073/pja.v11i2.72456.
- Vásquez C., Colmenárez Y. Invasive mite species in the Americas: bioecology and impact. In: Haouas D., Hufnagel L. (Eds.) *Pests Control and Acarology*. London: IntechOpen, 2020. DOI 10.5772/intechopen.86127.
- Walter D.E., Krantz G.W. Collecting, rearing and preparing specimens. In: Krantz G.W., Walter D.E. (Eds.) *A Manual of Acarology*. Texas Tech Univ. Press, 2009;91-92.
- Zélé F., Weill M., Magalhães S. Identification of spider-mite species and their endosymbionts using multiplex PCR. *Exp. Appl. Acarol.* 2018;74(2):123-138. DOI 10.1007/s10493-018-0224-4.

ORCID ID

A.V. Разуваева orcid.org/0000-0002-0746-3660
E.G. Ульянова orcid.org/0000-0002-9154-5238
E.S. Сколотнева orcid.org/0000-0001-8047-5695
I.V. Андреева orcid.org/0000-0001-5627-8667

Благодарности. Исследование профинансировано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, номер гранта FWNR-2022-0007.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.07.2022. После доработки 25.12.2022. Принята к публикации 07.01.2023.

LIM-kinase 1 effects on memory abilities and male courtship song in *Drosophila* depend on the neuronal type

A.V. Zhuravlev¹✉, E.S. Zalomaeva^{1,2}, E.S. Egozova², A.D. Emelin², V.V. Sokurova², E.A. Nikitina^{1,2}, E.V. Savvateeva-Popova¹

¹ Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

² Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russia

✉ beneor@mail.ru

Abstract. The signal pathway of actin remodeling, including LIM-kinase 1 (LIMK1) and its substrate cofilin, regulates multiple processes in neurons of vertebrates and invertebrates. *Drosophila melanogaster* is widely used as a model object for studying mechanisms of memory formation, storage, retrieval and forgetting. Previously, active forgetting in *Drosophila* was investigated in the standard Pavlovian olfactory conditioning paradigm. The role of specific dopaminergic neurons (DAN) and components of the actin remodeling pathway in different forms of forgetting was shown. In our research, we investigated the role of LIMK1 in *Drosophila* memory and forgetting in the conditioned courtship suppression paradigm (CCSP). In the *Drosophila* brain, LIMK1 and p-cofilin levels appeared to be low in specific neuropil structures, including the mushroom body (MB) lobes and the central complex. At the same time, LIMK1 was observed in cell bodies, such as DAN clusters regulating memory formation in CCSP. We applied GAL4 × UAS binary system to induce *limk1* RNA interference in different types of neurons. The hybrid strain with *limk1* interference in MB lobes and glia showed an increase in 3-h short-term memory (STM), without significant effects on long-term memory. *limk1* interference in cholinergic neurons (CHN) impaired STM, while its interference in DAN and serotonergic neurons (SRN) also dramatically impaired the flies' learning ability. By contrast, *limk1* interference in *fruitless* neurons (FRN) resulted in increased 15–60 min STM, indicating a possible LIMK1 role in active forgetting. Males with *limk1* interference in CHN and FRN also showed the opposite trends of courtship song parameters changes. Thus, LIMK1 effects on the *Drosophila* male memory and courtship song appeared to depend on the neuronal type or brain structure.

Key words: *Drosophila*; LIMK1; conditioned courtship suppression paradigm; memory; forgetting; dopaminergic neurons; cholinergic neurons; *fruitless*; male courtship song.

For citation: Zhuravlev A.V., Zalomaeva E.S., Egozova E.S., Emelin A.D., Sokurova V.V., Nikitina E.A., Savvateeva-Popova E.V. LIM-kinase 1 effects on memory abilities and male courtship song in *Drosophila* depend on the neuronal type. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):250-263. DOI 10.18699/VJGB-23-31

Влияние LIM-киназы 1 на память и брачную песню самцов дрозофилы зависит от типа нейронов

А.В. Журавлев¹✉, Е.С. Заломаева^{1,2}, Е.С. Егозова², А.Д. Емелин², В.В. Сокурова², Е.А. Никитина^{1,2}, Е.В. Савватеева-Попова¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

✉ beneor@mail.ru

Аннотация. Сигнальный каскад ремоделирования актина, в состав которого входят LIM-киназа 1 (LIMK1) и ее субстрат кофилин, участвует в регуляции различных процессов в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных. *Drosophila melanogaster* широко используется как модельный объект для изучения механизмов формирования, сохранения и воспроизведения памяти, а также забывания. Ранее активное забывание у дрозофилы исследовали с помощью классического павловского ольфакторного обучения. Было показано, что в разных формах забывания участвуют специфические дофаминергические нейроны и компоненты актинового каскада. В данной работе мы оценивали роль LIMK1 в процессах памяти и забывания у дрозофилы в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания. В мозге дрозофилы уровень LIMK1 и фосфокофилина избирательно снижен в отдельных структурах нейропила, включая лопасти грибовидных тел и центральный комплекс. В то же время LIMK1 присутствует в телах нервных клеток, таких как кластеры дофаминергических нейронов, регулирующие формирование памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания. С использованием системы бинарного скрещивания GAL4 × UAS мы инициировали РНК-интерференцию *limk1* в различных типах нервных клеток. У гибридных линий с интерференцией *limk1* в лопастях грибовидных тел и глии наблюдалось усиление 3-часовой краткосрочной памяти, без видимого влияния на долгосрочную память. Интерференция *limk1* в холинергических нейронах приводила к снижению краткосрочной памяти, в дофаминергических и серотонинергических нейронах ее результатом было также существенное нарушение способности мух к обучению. Напротив, интерференция *limk1* в нейронах *fruitless* усиливала 15–60-минутную краткосрочную память, что указывает на возможную роль LIMK1 в процессах активного забывания. У самцов с интерференцией *limk1* в

холинергических и *fruitless* нейронах также были отмечены разнонаправленные изменения параметров брачной песни. Таким образом, эффекты LIMK1 на память и брачную песню самцов дрозофилы определяются типом нервных клеток или структурой мозга.

Ключевые слова: дрозофила; LIMK1; условно-рефлекторное подавление ухаживания; память; забывание; дофаминергические нейроны; холинергические нейроны; *fruitless*; брачная песня самца.

Introduction

Memory formation and forgetting serve as the basis of behavioral plasticity. Whereas memory is a specific process of information acquisition, storage and retrieval by the nervous system, active forgetting is defined as “a mechanism or series of mechanisms to remove memories that become unused” (Davis, Zhong, 2017). Associative memory formation and active forgetting occur in both mammals and invertebrates, including *Drosophila melanogaster* (Medina, 2018), which is a well-known object of classical genetics. Having a short life cycle and relatively simple nervous system, the fruit fly makes it easy to perform genetic analysis of the molecular basis of behavioral and cognitive processes.

There are several experimental techniques to form associative memory in *Drosophila*, including short-term memory (STM) and protein synthesis-dependent long-term memory (LTM). The most widely used technique is classical Pavlovian learning with negative electroshock reinforcement, or olfactory aversive learning (OAVL), which revealed genes responsible for different types of memory (Tully et al., 1994). More natural is conditioned courtship suppression paradigm (CCSP) (Siegel, Hall, 1979; Kamyshev et al., 1999). GAL4 × UAS binary expression system (Duffy, 2002) is used to study the effects of specific genes on memory processes. The fine neural organization of the mushroom bodies (MB), a principle structure responsible for associative olfactory learning in *Drosophila*, was evaluated in detail. The MB output neurons (MBON) are the main effectors of MB, whereas specific clusters of dopaminergic neurons (DAN) regulate the activity of MB – MBON synaptic contacts (Aso et al., 2009, 2014a, b). Among them are aSP13 DAN of the protocerebral anterior medial cluster (PAM), which innervate $\gamma 5$ area of MB, playing a crucial role in CCSP learning and memory (Keleman et al., 2012).

The molecular and neural mechanisms of active forgetting implicate the activity of DAN and Rac1-dependent signal pathways (Medina, 2018). Small GTPases of the Rho family, including Rho and Rac, regulate neuronal actin polymerization during the *Drosophila* nervous system development. Rho via its effector ROCK or Rac/Cdc42 via its effector Pak activate LIM-kinase 1 (LIMK1), which phosphorylates *Drosophila* cofilin (twinstar) protein, blocking its actin-depolymerization activity and inhibiting axon growth. Rac also acts through Pak-independent pathway to antagonize LIMK1 and promote axon growth (Ng, Luo, 2004). In addition to its role in neurogenesis, Rac is crucial for both interference-induced and passive forgetting in OAVL paradigm. PAK/LIMK1/cofilin pathway probably acts downstream Rac1 (Shuai et al., 2010). Forgetting specific types of memory depends on different signal proteins (Zhang et al., 2016; Gao et al., 2019).

Forgetting in OAVL paradigm is caused by several DAN of the protocerebral posterior lateral 1 (PPL1) cluster, which innervates some MB structures, such as pedunculus, lower and upper stalk. Memory acquisition and forgetting are regu-

lated by different dopamine receptors, dDA1 and DAMB respectively (Berry et al., 2012). Coincidence of conditioned and unconditioned stimuli creates a memory trace in MBON- $\gamma 2\alpha'1$, probably inhibiting the MB > MBON- $\gamma 2\alpha'1$ synapses. The unconditioned stimulus alone activates DAN- $\gamma 2\alpha'1$, which in turn disinhibit MB > MBON- $\gamma 2\alpha'1$ synapses and cause forgetting (Berry et al., 2018). DAN that innervate the MB $\alpha\alpha'$ tip induce the interference-based forgetting through the scaffold protein Scribble, binding together Rac1, PAK3 and cofilin (Cervantes-Sandoval et al., 2016).

Whereas multiple data prove the importance of DAN and actin-remodeling signal pathway for forgetting in OAVL paradigm, there is virtually no data for molecular mechanisms of memory decay in CCSP. Effects of LIMK1-dependent signal cascade on CCSP learning and memory were firstly shown for the temperature-sensitive mutant *agn^{ts3}*, with LIMK1 increase in the adult brain compared to the wild type *Canton-S* (CS). Temperature rise leads to a decrease in *agn^{ts3}* LIMK1 level, simultaneously restoring its learning ability and 3 h memory, which are drastically impaired in the norm (Medvedeva et al., 2008). *agn^{ts3}* has multiple polymorphisms within and near *limk1* gene, as well as a changed profile of microRNA expression, and can serve as a model object for Williams syndrome (Nikitina et al., 2014; Savvateeva-Popova et al., 2017). The temporal profile of STM learning index (LI) was assayed in CCSP for *agn^{ts3}*, as well as for the wild-type strains with *limk1* polymorphisms, CS and *Oregon R*. Only CS was able to learn and store memory up to 24 h (Zalomaeva et al., 2021).

The behavioral effects of LIMK1 changes in *agn^{ts3}* do not give information about specific cell types, where LIMK1 can be involved in learning and memory. In this study, we performed the analysis of memory decay for several *Drosophila* GAL4 × UAS strains with neuronal type-specific *limk1* RNA interference. LIMK1 distribution in the *Drosophila* brain structures was studied in detail using confocal microscopy. The effect of *limk1* interference on fly memory ability depended on both neural type and memory form. LIMK1 also appeared to be involved in regulation of male courtship song: *limk1* interference in different neuronal types specifically affected some song parameters.

Materials and methods

***Drosophila* strains.** Fly strains were provided by the Research Center “Biocollection of Pavlov Institute of Physiology RAS for the study of integrative mechanisms of the nervous and visceral systems”. The strain numbers (#) are given in accordance with the Research Center and Bloomington *Drosophila* Stock Center, USA (Cook et al., 2010). The following strains were used:

1. *Canton-S* (CS) – the wild-type strain with *limk1* polymorphisms.
2. *agn^{ts3}* – temperature-sensitive mutation on CS genetic background with *limk1* polymorphisms, characterized by learning and memory defects.

3. Strains expressing GAL4 in specific neuronal types:
#6794: w[*]; P{w[+mC]=nrv2-GAL4.S}8 P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}eg[T10]. GAL4 and green fluorescent protein (GFP) are expressed in nervous system under *Nrv2* regulatory element;
#6793: w[*]; P{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4}19B P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[T2]. GAL4 and GFP are expressed in cholinergic neurons (CHN) under *ChAT* and *VAcH* regulatory elements;
#7009: w[1118]; P{w[+mC]=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]. GAL4 is expressed in dopaminergic (DAN) and serotonergic (SRN) neurons;
#30027: w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}fru[NP0021]. GAL4 is expressed in *fruitless* neurons regulating mating behavior.
4. Act-GAL4: w[1118]; P{w[+mC]=} 25FO1/CyO, y[+]; *Canton-S* background. GAL4 is expressed in the whole body under actin promoter.
5. Strains with UAS-dependent *limk1* suppression:
#26294: y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02063}attP2. The strain expresses interfering RNA against *limk1* (RNAi) under UAS (*limk1-KD*, knockdown).
#36303: y[1] v[1]; P{y[+t7.7]=CaryP}attP2. The control strain with genetic background identical to that for #26294, but lacking RNAi (*limk1*“+”).
6. Strains with GFP gene regulated by UAS:
#32186: w[*]; P{y[+t7.7] w[+mC]=10XUAS-IVS-mCD8::GFP}attP40.
#32202: w[*]; P{y[+t7.7] w[+mC]=10XUAS-IVS-GFP-WPRE}attP2.

To induce *limk1* RNA interference in specific neuronal types, a strain carrying GAL4 activator expressed under tissue-specific promoter was crossed to UAS strain #26294. The cross product of a GAL4 strain and #36303 strain served as a control.

Flies were raised on the standard yeast–raisin medium at 25±0.5 °C and a 12:12 daily illumination cycle. For behavioral tests, experimental males were collected without anesthesia and kept individually. 5–6-day-old males were used in experiments. Females (CS) were collected as virgins and brought together with CS males for fertilization in CCSP one day before experiment.

Antibodies. Primary antibodies: Rat anti-LIMK1 multi-specific monoclonal (Enzo Life Sciences, ALX-803-343-C100); mouse anti-*Drosophila* cysteine string protein (CSP); rabbit anti-*Drosophila* tyrosine hydroxylase (TH) (Abcam, ab128249); rabbit anti-GFP (Abcam, ab290).

Secondary antibodies: Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A32723), donkey-anti-rat Alexa Fluor 594 (ThermoFisherScientific, A-21209), goat anti-rabbit Alexa Fluor 633 (Invitrogen, A21071).

RNA extraction and RT-PCR analysis of *limk1* expression. The level of *limk1* expression was assayed using semi-quantitative PCR in complex with reverse transcription (RT-PCR). Flies were anesthetized by freezing. 10 male flies or 70 male heads were homogenized in 300 µl TRI reagent (MRC, TR 118). Total RNA was extracted from homogenates according to the manufacturer’s protocol. The quality of RNA was checked by 1.5 % agarose gel electrophoresis. 1 µg

RNA was reverse-transcribed by MMLV reverse transcriptase (Evrogen, #SK022S) according to the manufacturers’ protocol, using random hexamer primers and RNase inhibitor (Syntol, #E-055). Semi-quantitative PCR was performed on a StepOne Plus (Applied Biosystems, Inc., USA) using qPCRmix HS SYBR+LowROX (Evrogen, #PK156L) containing direct and reverse primers (0.5 mM each). Baseline and cycle threshold values were determined by automatic analysis using StepOne software v2.3 (Applied Biosystems, USA). *rpl32* transcript was used as an internal control. The predesigned *limk1* primers (PP12636 in FlyPrimerBank, <http://www.flyrnai.org/flyprimerbank>) were used to bind all five *limk1* cDNA isoforms, both premature and mature forms, as primers do not span the exon-intron borders. The relative *limk1* transcript level was calculated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method. The number of biological replicates (independent RNA extractions with reverse transcription) was 3–5, the number of technical replicates was 3.

The primer sequences were the following:

rpl32:

Forward: 5'-TATGCTAAGCTGTCGCACAAATGGC-3'

Reverse: 5'-GTTCTGCATGAGCAGGACCTCCA-3'

limk1:

Forward: 5'-GTGAACGGCACACCAGTTAGT-3'

Reverse: 5'-ACTTGCACCGGATCATGCTC-3'

PCR parameters:

1. 1 cycle: 95 °C – 5 min.
2. 45 cycles. 95 °C – 20 s, 60 °C – 20 s, 72 °C – 20 s, 77 °C – 15 s (detection).
3. Melting curve: 95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min, 60–95 °C ($\Delta 0.3$ °C, 15 s).

Immunofluorescent staining of *Drosophila* brains.

5–6-day-old imago males were anesthetized by freezing. The brains were prepared in PBS buffer (pH 7.5) using needle-sharp tweezers (Merck, T4412), fixed in 4 % paraformaldehyde in PBS for 1 h at RT and stained according to (Thapa et al., 2019), without a freezing stage. Antibodies were diluted in PBT (0.2 % Tween 20, 5 % BSA in PBS) as 1:200, for anti-CSP – 1:20. Previously, for better staining of brains, we increased the time of incubation with primary antibodies up to 5 days (Zhuravlev et al., 2020). Here, the incubation was performed at 4 °C for 3 days (with primary antibodies) or overnight (with secondary antibodies). Brains were mounted with Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector laboratories, H-1200-10).

Protein distribution analysis in the brain by confocal microscopy. Brains were scanned frontally using laser scanning confocal microscopy (LSM 710 Carl Zeiss; Confocal microscopy Resource Center; Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia).

Scanning was performed using X63 objective at different depths (z-step 2 µm). Images were analyzed using Fiji software. The brain structures were visually mapped using the *Drosophila* brain online atlas (Virtual Fly Brain). To measure the average level of LIMK1 inside the brain structures, the average signal intensity was measured in three small square areas (~10 × 10 µm) within each of the structures. The average values were obtained and normalized to the average structure intensity for the given brain. Colocalization Threshold analysis

was performed to measure co-localization of LIMK1 with neurospecific markers. To prepare figures, auto contrast function was used for each optical slice.

Learning and courtship suppression tests in *Drosophila* males. Flies learning and STM were estimated in CCSP, as described in (Zhuravlev et al., 2022). In the case of long term memory (LTM), learning was performed by placing flies in food-containing glasses (20 mm diam., ~20 mm high) for 5 h (Kamyshev et al., 1999). Courtship index (CI) and learning index (LI) were estimated at the following time points after learning: for short-term memory (STM) analysis: 0 min (learning), 3 h; for STM decay analysis: 15, 30, 60 min, 24 h; for LTM analysis: 0 min, 2 days, 8 days. In all groups, naive males (without mating experience) served as a control to calculate LI:

$$LI = [(CI_N - CI_T) / CI_T] \times 100 \% = (1 - CI_N / CI_T) \times 100 \%,$$

where CI_N is the middle CI for naive males, and CI_T is the middle CI for males after training. The naive and trained males were the same age. The decrease in LI compared to LI (0 min) was considered a time-dependent memory decay. The decrease in LI for a mutant strain compared to that for the wild-type strain CS was considered a strain-specific impairment of learning or memory.

Courtship song analysis. The 5-day-old imago male courtship song was recorded as in (Savvateeva-Popova et al., 2008). A naive male of the studied line and a fertilized female (CS) were placed together in a Perplex chamber with a latticed bottom on top of a microphone. The chamber was placed in a foam box in a soundproof room. The sounds were recorded for 5 min using Audacity software (Mazzoni, Dannenberg, 2020). The sound signals were filtered to exclude noises, obtaining signals within 100–800 Hz. The level of noise was decreased using a standard Audacity plugin. The software *Drosophila* courtship song analysis (DCSA) (Iliadi et al., 2009) was used to automatically detect pulse and sine song components.

The results of analysis were manually edited. The mean values of the song parameters were calculated for each fly. The following parameters were estimated: pulse song index (PInd, % of the total time), pulse song initiation frequency (PFR; 100/s), sine song index (SInd, % of the total time), sine song frequency (SFR, 100/s), interpulse interval (IPI, ms), period of song pulse train (Per, s), intertrain interval (ITI, ms), train duration (TrainDur), pulse number in train (PulseN), sine song duration (SDur, ms), sine song amplitude (SAmp, C.U.), IPI variance (Var(IPI), ms^2). Per is the time between the starts of the neighboring trains. ITI is the time between the end of the previous and the start of the next train.

Statistical analysis. Analysis of LIMK1 mRNA level was performed using two-sided *t*-test, Social Science Statistic online resource ($p < 0.05$). Analysis of LI and courtship song parameters was performed using two-sided randomization test at significance level α of 0.05 ($n = 20$), using *Drosophila* Courtship Lite software (Nikolai Kamyshev, 2006, nkamster@gmail.com), with 10000 iterations. The program is freely available from the author upon request. Randomization test was reported to be better for LI comparison than *t*-test or some nonparametric tests (Kamyshev et al., 1999). Court-

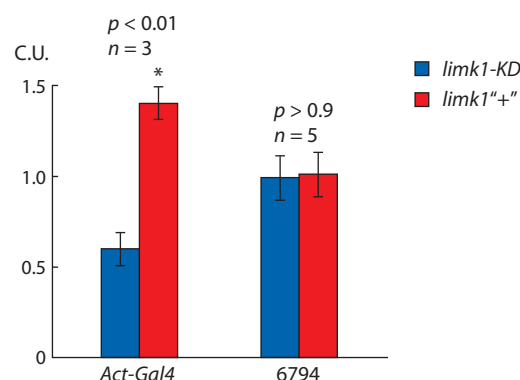


Fig. 1. Comparative levels of *limk1* RNA in the UAS > GAL4 hybrids with and without *limk1* RNA interference.

X axis: GAL4 strains. Y axis, conditional units (C.U., expression levels are normalized to the average value). Statistical differences: * between *limk1-KD* > GAL4 and *limk1^{+/+}* > GAL4 (two-sided *t*-test; *p* and *n* are shown above the charts). Standard error is shown.

ship song parameters were also analyzed using two-sided Mann–Whitney U-test. Python 3 scripts were used to draw the box plots charts.

Results

limk1 RNA level in *Drosophila* UAS × GAL4 hybrids

To check that GAL4 really induces *limk1* RNA interference in 26294 strain, we compared *limk1* RNA level in the UAS (f) > GAL4 (m) hybrids. Females with and without transgenic RNAi for *limk1* suppression (*limk1-KD* and *limk1^{+/+}*, respectively) were crossed to *Act-GAL4* males, expressing GAL4 in the whole body. The level of total *limk1* RNA was approximately 2-fold lower in the hybrid with *limk1* interference. These data confirmed the efficiency of RNAi-dependent *limk1* suppression in 26294 strain (*limk1-KD*) upon its activation by GAL4. At the same time, there were no differences for *limk1-KD* > 6794 and *limk1^{+/+}* > 6794, where RNA expression was measured in heads and was regulated by neuronal type-specific GAL4 (Fig. 1). Thus, *limk1* RNA differences after neural type-specific *limk1* RNA interference might be local or too low to be detected in the whole *Drosophila* heads.

LIMK1 distribution in the *Drosophila* brain

When studying LIMK1 distribution, we focused on the central part of the *Drosophila* brain, without the optic lobes (OL), mainly at the level of the superior medial protocerebrum (SMP) and gamma-lobes (γ L) of MB. Here the PAM clusters of DAN are located (Mao, Davis, 2009), responsible for the *Drosophila* courtship learning and memory (Keleman et al., 2012). Additionally, the area including the central complex (CC) and calyx (Cal) surrounded by Kenyon cells (KC) was studied. The CSP-positive neuropil structures and tyrosine hydroxylase (TH)-positive DAN cell bodies and processes served as landmarks in describing the LIMK1 distribution. The following description is given for the wild-type strain CS (see the Table and Suppl. Material 1)¹.

¹ Supplementary Materials 1–6 are available in the online version of the paper: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx9.pdf>

LIMK1 and TH distribution in the *Canton-S* brain (visual analysis)

Z	N	Neuropil structures (CSP)	TH-positive structures	LIMK1 level
I	0	AL and SMP; the part of γ L is observed as a shading (CSP lever is lower)	Two bilaterally symmetrical clusters of PAM cell bodies, the processes of which form two semicircular tracts (#1), enveloping SMP below	AL and SMP: high; thin tissue layers resembling the neuropil glia: high; cell bodies surrounding neuropil: relatively low; cell nuclei: low
II	3	γ L of MB, subdivided into three unequal parts; the putative γ 5 area is marked with an asterisk (*); AOT lateral to SMP	Semicircular tracts (#1) move laterally; two tracts (#2) above SMP; granularity (#3) above γ L. TH level is low in γ L	γ L: lower than in SMP; the thin tissue layers surrounding AL and SMP: high
III	7	γ L is half hidden by β 'L, with the horizontal β L below it. The beginning of α / α 'L is seen	Granularity (#3) above and laterally the β 'L area; tracts (#2) join at the central line (#4). TH level is low in β L	All MB lobes: low
IV	11	α L and α 'L. The part of γ L (#7) lateral to α L	Granularity (#5) at the area of β 'L tips, where the PAM processes converge	Area #5: low; granularity along the central axis of the brain (#6): high; γ L (#7): very low
V	14	The tips of α L and α 'L; the part of EB	Area 5 is subdivided into two (#8), corresponding to β 'L tips. Commissure (#9) above (#8)	Area #8: low; EB: low
VI	16	EB; α L and γ L join to the pedunculus (Ped) of MB	Commissure #9 above EB	Ped and EB: low; the semicircular granularity (#10) above and laterally EB: high; commissure (#11) between EB and the esophagus (ES): high
VII	20	CC (EB, FB and No)	Commissure #9 continues laterally	CC and Ped: low; tissue layers surrounding neuropil structures: high
VIII	26	CC (FB), W, Ped	Tracts around FB	Commissure (#12) above CC and semicircular structures (#13) surrounding wedge: high
IX	29	CC is no longer visible	The cell bodies and processes of DAN clusters around Cal are partly visible	The great commissure (#GC) above the ES: high; glia-like layers among neuropil: high
X	36	Cal, KC and PB; Ped below Cal – a small shading (#14)	DAN clusters around Cal: PPL1 and PPM2	Cal and PB: high; KC: relatively low; glia-like layers (#15) in the bottom part near ES: high

Note. The depth of the studied zone (Z) is given for the brain optical slices, from the PAM cell bodies to CC (I–V) or from CC to Cal (VI–X). N is the number of the brain optic slice for a given zone (step 2 μ m). For different brains, there may be slight differences in depth of the given N. The brain structures (here and below): α , α ', β , β ' and γ L – the corresponding lobes of MB, AL – the antennal lobes, AOT – the anterior optic tubercle, Cal – the calyx of MB, CC – the central complex, EB – the ellipsoid body of CC, ES – the esophagus, FB – the fan-shaped body of CC, KC – the Kenyon cells, MB – the mushroom body, MBI – the median bundle, No – the noduli of CC, PB – the protocerebral bridge, Ped – the pedunculus of MB, SEG – the subesophageal ganglion, SMP – the superior medial protocerebrum, W – wedge. DAN clusters, according to (Mao, Davis, 2009): PAM – the protocerebral anterior medial cluster, PPL – the protocerebral posterior lateral clusters, PPM – the protocerebral posterior medial clusters.

The distribution of DAN clusters corresponded to that described in (Mao, Davis, 2009). PAM clusters were clearly observed near SMP, with processes extending towards the central part of the brain. The processes formed glomerular structures around the MB horizontal lobes (γ , β and β 'L), probably being the synaptic endings innervating the correspond areas. The structure #3 was located above γ L, the structures #5 and 8 – in the β 'L area, the commissure #9 was seen in the central part of the brain. TH signal was relatively low in β L (see Suppl. Material 1). PPL1, PPM2 and other DAN clusters were observed around Cal, sending their processes to the different brain areas (Fig. 2, a).

LIMK1 was concentrated in the neuropil structures of the anterior part of the brain, such as SMP and AL. The LIMK1-positive granularity was observed inside SMP, between the β 'L tips (#8) and around the ellipsoid body (EB) of CC (#10, 11). LIMK1 level was also high in thin tissue layers adjacent to neuropil and some neural tracts, such as #12 around the great commissure, #13 around wedge (W) and #15 near esophagus (ES), morphologically resembling glia (Hartenstein,

2011). LIMK1 signal was lower in cell bodies of the neurons surrounding AL (ALCB), probably being the cell bodies of the projection neurons, as well as in KC surrounding Cal. Here, LIMK1 was mainly concentrated in the cytoplasm, beyond the nuclei. LIMK1 level was significantly decreased in all the MB lobes and pedunculus (Ped), as well as in the CC structures, whereas in Cal and the protocerebral bridge (PB) it was relatively high (see Suppl. Material 1). LIMK1 and TH colocalization was observed in SMP, AL, Cal, the TH-positive cells and processes, and in glomerular densities, such as #3, 5 and 6 (see Fig. 2, b).

To check that the antibody specifically binds to LIMK1, the distribution of LIMK1 main product p-cofilin was assayed in CS. The pattern of p-cofilin distribution was generally similar to that for LIMK1 (Suppl. Material 2). The level of p-cofilin was low in MB (including Cal) and CC (mostly EB, as well as in the case of LIMK1). In contrast to LIMK1, p-cofilin was mainly concentrated in the cell nuclei in the peripheral area of the fly brain, such as Kenyon cells around Cal, as well as in PB, subesophageal ganglion (SEG), and cell bodies surrounding

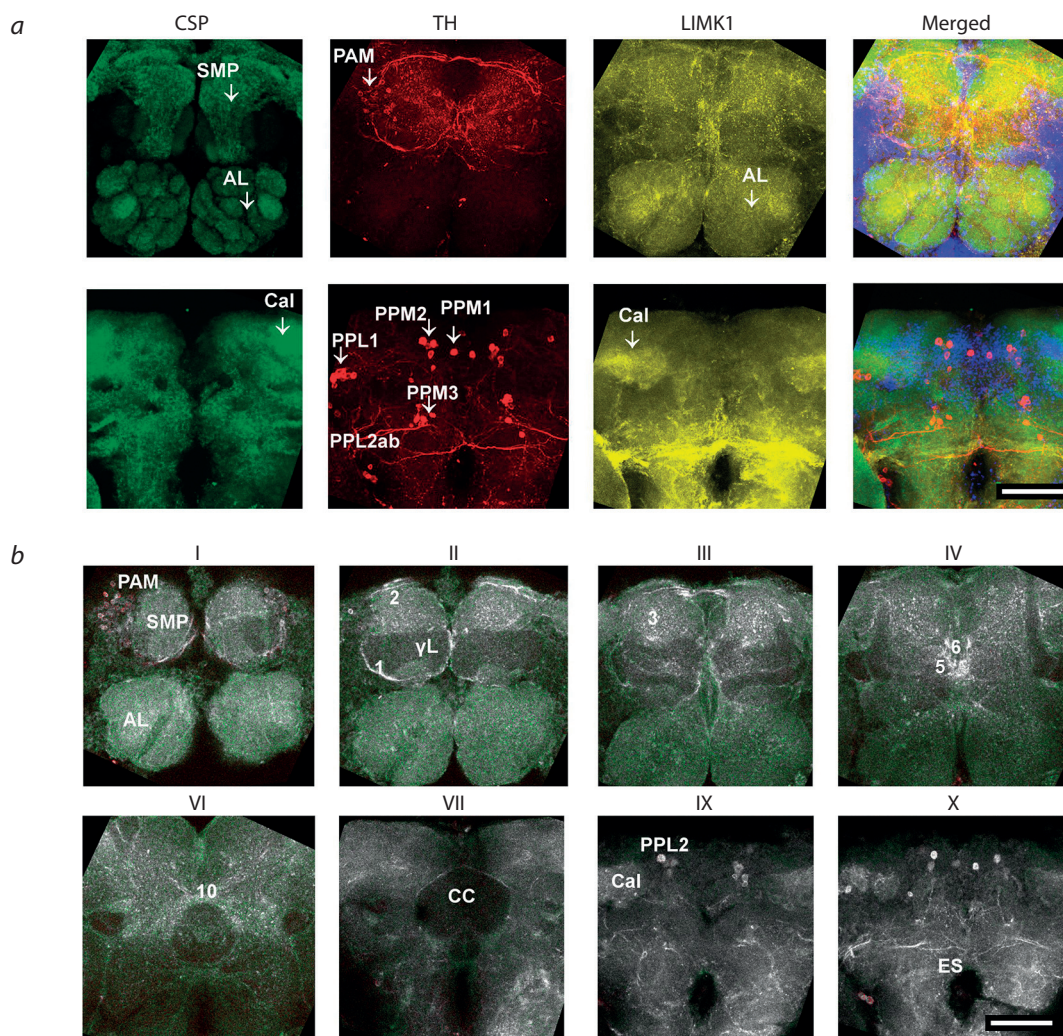


Fig. 2. LIMK1 spatial distribution in the CS brain.

a, Z-projection. AL level (above) and Cal level (below). Color scheme: green – CSP, red – TH, yellow – LIMK1, blue – DAPI.
b, Co-localization of TH and LIMK1 in different optic zones. Color scheme: green – LIMK1, red – TH, white – the areas of LIMK1 – TH co-localization. The scale bar size is 50 μm. See the Table for abbreviations and description of the optic zones.

AL. p-Cofilin was also localized in diffuse layers within the brain structures, such as EB, probably formed by glia. The p-cofilin-enriched cells were found in SEG, forming structures with two glomerular branches (*), and around CC structures, fan-shaped body (FB) and EB (**).

Several GAL4 activators were used to initiate *limk1* RNA interference. Both 6793 and 6794 strains specifically express the green fluorescent protein (GFP) under GAL4 promoter. In strain 6794, GAL4 was reported to be expressed in OL, thoracic ganglion, different nerves, and cortex glia (Sun et al., 1999; Okamoto, Nishimura, 2015). In 6794 > *limk1-KD* hybrid, GAL4-driven GFP expression was detected in glia-like cells, surrounding the neuropil structures, such as AL, SMP, CC and its parts, as well as in the MB lobes, Ped and some KC (Suppl. Material 3, *a*). GFP level was higher in αL and βL compared to α'L, β'L and γL. The signal was lower in Cal and virtually absent in most neuropil structures, such as AL, SMP, CC and others. Thus, *limk1* interference should occur in Cal and some glia cells, where the levels of both GAL4 and LIMK1 were relatively high. Similar distribu-

tion was observed in the control 6794 > *limk1*⁺ strain (see Suppl. Material 3, *b*). In the strain 6793, GAL4 is expressed in cholinergic neurons (CHN), with GFP signal in OL, AL with the surrounding interneurons, the parts of CC, the great commissure (GC), Cal and the mechanosensory area of SEG (Salvatterra, Kitamoto, 2001). In the strains 6793 > *limk1-KD* and 6793 > *limk1*⁺ (see Suppl. Material 3, *c*, *d*), we observed a strong GFP signal in cell bodies surrounding SMP and AL, as well as in some KC, several neuropil structures (AL, αβL, EB, FB), and GC. In all the studied strains, LIMK1 distribution character appeared to be similar to that in CS.

To check that GAL4 is active in 7009 and 30027 strains, we crossed them to strains expressing GFP under GAL4 promoter. In 7009 > 32186 hybrid, we observed a prominent GFP signal in cell clusters near SMP, morphologically similar to the TH-positive PAM clusters. Some cells might be SRN, but they constitute the minority of the observed neurons in this area (Albin et al., 2015; Kasture et al., 2018). The processes of PAM neurons extended to the horizontal MB lobes, including γL, and the densely innervated β'L tip (#5) connected by

a commissure, and to a much lesser extent the β L tip (Suppl. Material 4, a). EB was surrounded by the GFP-positive processes extending from different parts of the brain. The GFP-positive DAN around Cal were also observed. Hence, GAL4 activator of 7009 should suppress *limk1* inside DAN, including PAM neurons, which regulate memory storage in CCSP. The *fruitless*-positive neurons (FRN) are responsible for mating behavior. In 30027 > 32202 hybrid, we observed GFP in some KC, in the cell bodies located near SMP and AL, and glomerular structure, forming a ring-like structure around Ped (see Suppl. Material 4, b). Similar structures were described in (Yu et al., 2010). The distribution of LIMK1 in the hybrid strains with and without *limk1* knockdown in the above neurons was similar to that in CS (Suppl. Material 5).

The normalized intensity of LIMK1 signal was calculated for several brain structures (Fig. 3). The LIMK1 relative levels in specific structures were very similar for the CS brain and the average brain of all the strains. The biggest differences were observed for the TH-positive glomerular structure #6 (TH+(6)), which is possibly responsible for memory formation in CCSP. In the average brain, ALCB had the normalized LIMK1 level about 1. Compared to them, AL, SMP and TH+(6) structures had the higher LIMK1 level, whereas the MB lobes, EB and Ped had the lower LIMK1 level. In *agn^{ts3}*, AL and ALCB had the higher LIMK1 level compared to CS, whereas most of the rest studies structures had lower LIMK1 level. This corresponds to more contrast LIMK1 staining in *agn^{ts3}* relative to CS (Suppl. Material 6). There were no prominent differences after *limk1* knockout, except for several structures with minor changes. The interstrain differences might be local or beyond the resolution of the method.

3 h STM differs in hybrids with and without *limk1* interference

3 h STM was estimated for *limk1-KD* (f) > 6794 (m) and the control *limk1^{+/+}* (f) > 6794 (m) hybrids. In both cases, we observed the decrease of courtship index (CI) after learning, with its partial recovery after 3 h. The box plot height was minimal for CS and rather big for UAS $\times$ GAL4 hybrids, showing that the value of courtship suppression significantly varied for individual flies. All strains were capable to learn in CCSP, with learning index LI (0 h) immediately after training of about 60–70 % (Fig. 4, a). The CS LI was still high after 3 h, indicating STM preservation, in agreement with (Zhuravlev et al., 2022). The strain with *limk1* interference also preserved STM: although its LI (3 h) was only about 20 %, it did not statistically differ from that for CS, as well as from LI (0 h). In the control strain, LI (3 h) decreased compared to LI (0 h) and did not differ from zero, indicating the impaired STM. Thus, while 3 h memory storage or retrieval was impaired in the control strain, *limk1* interference seems to improve 3 h STM. At the same time, it did not affect the impaired 8 day LTM, with only minor positive effect on 2 day LTM (see Fig. 4, b).

Neuron type-specific *limk1* interference differentially affects STM dynamics

To investigate the dynamics of STM decay in different strains with *limk1* interference, we performed LI analysis immediately and 24 h after learning (Fig. 5). To exclude the possible effect

of eye color on learning and memory abilities, we applied GAL4 (f) > UAS (m) crossing scheme, where both the strain with *limk1* knockdown and the control strain had the same wild-type eye color. For 6794 activator (MB and glia), the control strain showed nearly the same LI within 24 h, whereas the strain with *limk1* interference demonstrated a steeper forgetting curve. Hence, 6794 > *limk1-KD* showed high LI after learning, but seemed to increase the speed of memory forgetting on the interval 0–30 min. *limk1* knockdown in CHN (6793) was associated with significant decrease of LI within 60 min after training.

For DAN and SRN activator (7009), both the strain with *limk1* interference and the control strain showed nearly the same dynamics of STM decay, except for 30–60 min period. *limk1* interference was associated with a dramatic defect on learning: LI did not differ from zero. LI (24 h) was negative in both hybrids, possibly being the effect of sensitization: males did not suppress the courtship activity but courted more actively some time after training. For FRN activator (30027), the effect of *limk1* knockdown was the opposite to that of MB/glia and CHN activators: *limk1* interference decreased the speed of forgetting, and LI (30 min) did not differ from zero. Thus, the effect of *limk1* interference on STM dynamics appeared to depend on the neuronal type.

LIMK1 interference in CHN and FRN neurons differentially affects courtship song parameters

Finally, we studied the influence of *limk1* interference on the male courtship song parameters. The hybrids with CHN and FRN drivers were studied (Fig. 6). There were no interstrain differences in interpulse interval (IPI), the species- and population-specific parameter (Ritchie et al., 1994), and IPI variance (Var(IPI)), the marker of neurodegenerative processes (Savvateeva-Popova et al., 2003). *limk1* interference in CHN (6793) decreased the pulse song index and frequency (PInd, PFr), increasing the mean period (Per), intertrain interval (ITI), train duration (TrainDur), sine song duration (SDur) and train pulse number (PulseN). On the contrary, in the strain with FRN activator (30027), *limk1* interference resulted in PFr increase, as well as Per, ITI, SInd and SDur decrease. *limk1* knockdown by two different activators had the opposite effects on PInd, PFr, Per, ITI and SDur, leveling the initial differences between SInd, TrainDur and PulseN. Thus, *limk1* interference in CHN seemed to decrease the rate of switching from the singing mode to silence mode and back, resulting in longer trains and ITI, while *limk1* interference in FRN neurons generally had the opposite effect.

Discussion

In mammals, LIMK1- and cofilin-dependent actin remodeling is widely involved in regulation of synaptic processes, such as exocytosis, receptor trafficking and remodeling of dendritic spines. These processes underlay long-term potentiation (LTP), long-term depression (LTD) and different forms of memory. LIMK1 also affects gene expression through CREB and LTM formation. Deregulation of LIMK1-dependent actin remodeling is involved in multiple pathologies, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, Williams syndrome, schizophrenia, and autism (Ben Zablah et al., 2021).

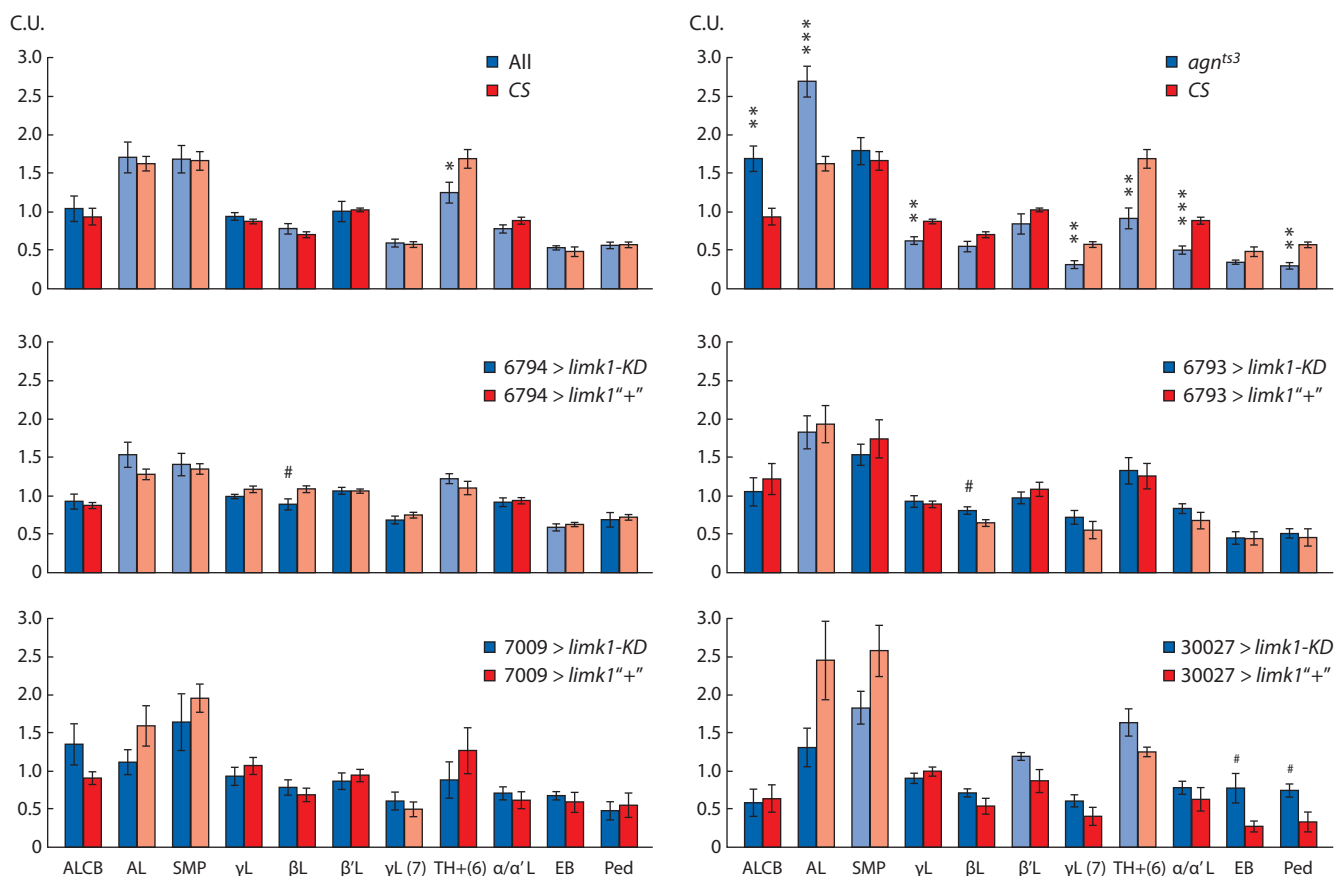


Fig. 3. LIMK1 relative level in different brain structures.

The normalized levels are shown in conventional units (C.U.). All – the averaged brain of the all studied strains. Statistical differences (two-sided *t*-test): * from CS ($p < 0.05$, 0.01, 0.001 for one, two and three asterisks, respectively); # from the control hybrid without *limk1* interference; blue > cyan and red > pink color change – the difference from ALCB ($p < 0.05$; blue and red – no difference). $N = 47-61$ (All), 5–6 (CS), 4–6 (*agn^{ts3}*), 7–8 (6794 > *limk1*-KD), 7–10 (6794 > *limk1*^{+/+}), 5–6 (6793 > *limk1*-KD), 6–7 (6793 > *limk1*^{+/+}), 3–5 (7009 > *limk1*-KD), 3–5 (7009 > *limk1*^{+/+}), 4 (30027 > *limk1*-KD), 3–4 (30027 > *limk1*^{+/+}). Standard error is shown.

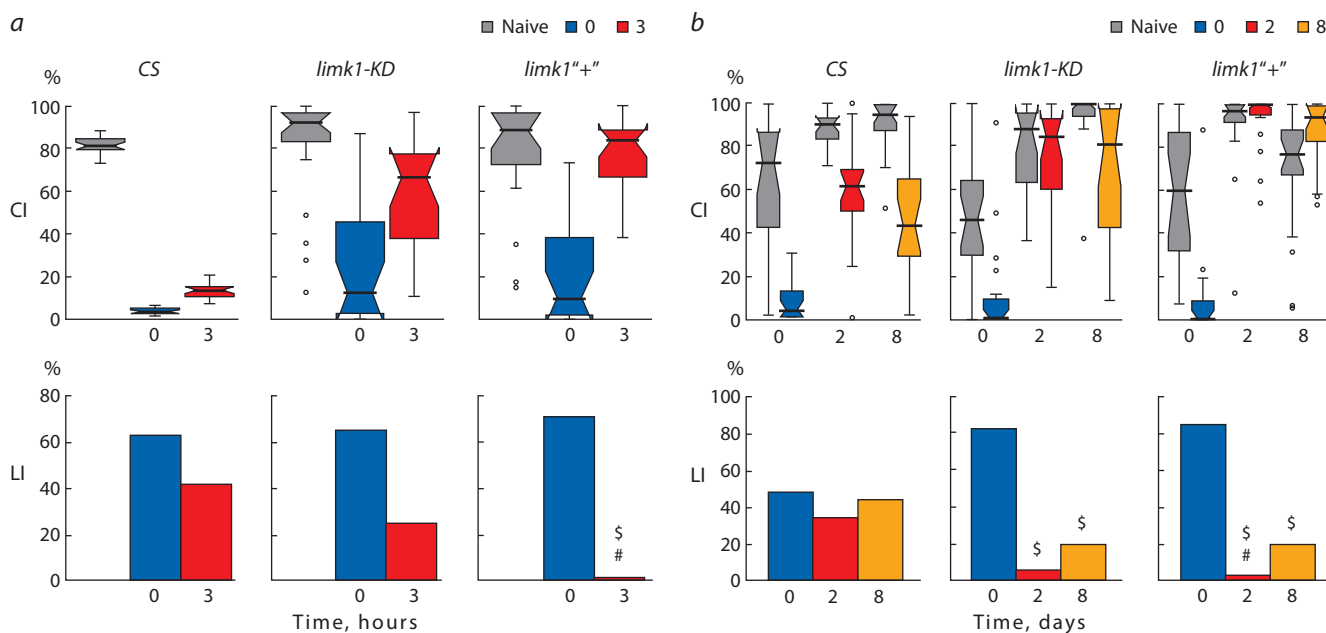


Fig. 4. The memory abilities of the *Drosophila* strain with *limk1* suppression by 6794 activator.

a, STM. *b*, LTM. CI – courtship index; box plot and whisker chart, median is shown by the bold black line. LI – learning index. Statistical differences: # from CS, \$ from LI (0 h/0 day) (two-sided randomization test; $p < 0.05$, $n = 20$).

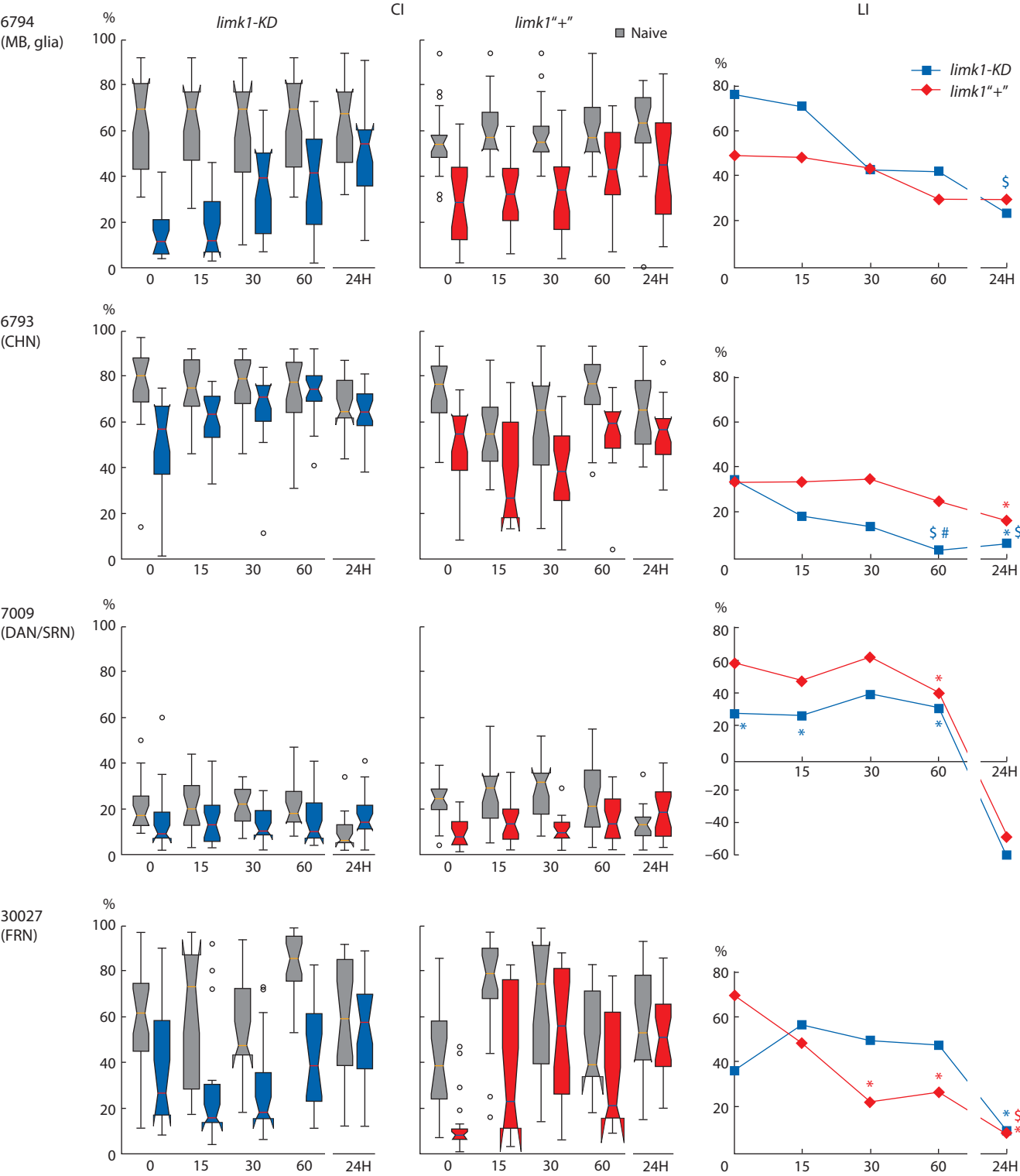


Fig. 5. STM dynamics in *Drosophila* strains with neuron type-specific *limk1* suppression.
CI – courtship index, LI – learning index. X axis: time (min; 24H – 24 hours). Statistical differences: # from CS, \$ from LI (0 min), * no difference from zero (two-sided randomization test; $p < 0.05$, $n = 20$).

In mature neurons, actin is enriched in both pre- and post-synaptic structures, such as dendritic spines, regulated by Rho signaling pathway. The action of LIMK1 on actin polymerization and memory processes is rather complex, being dependent on the mode of LIMK1 regulation (transient or

long-term overexpression) and cofilin level. While the active cofilin destabilizes fibrillar actin, in high concentrations it increases actin polymerization and nucleates actin filaments in dendritic spines during long-term potentiation (reviewed in Cuberos et al., 2015). Thus, it is hard to predict the integral

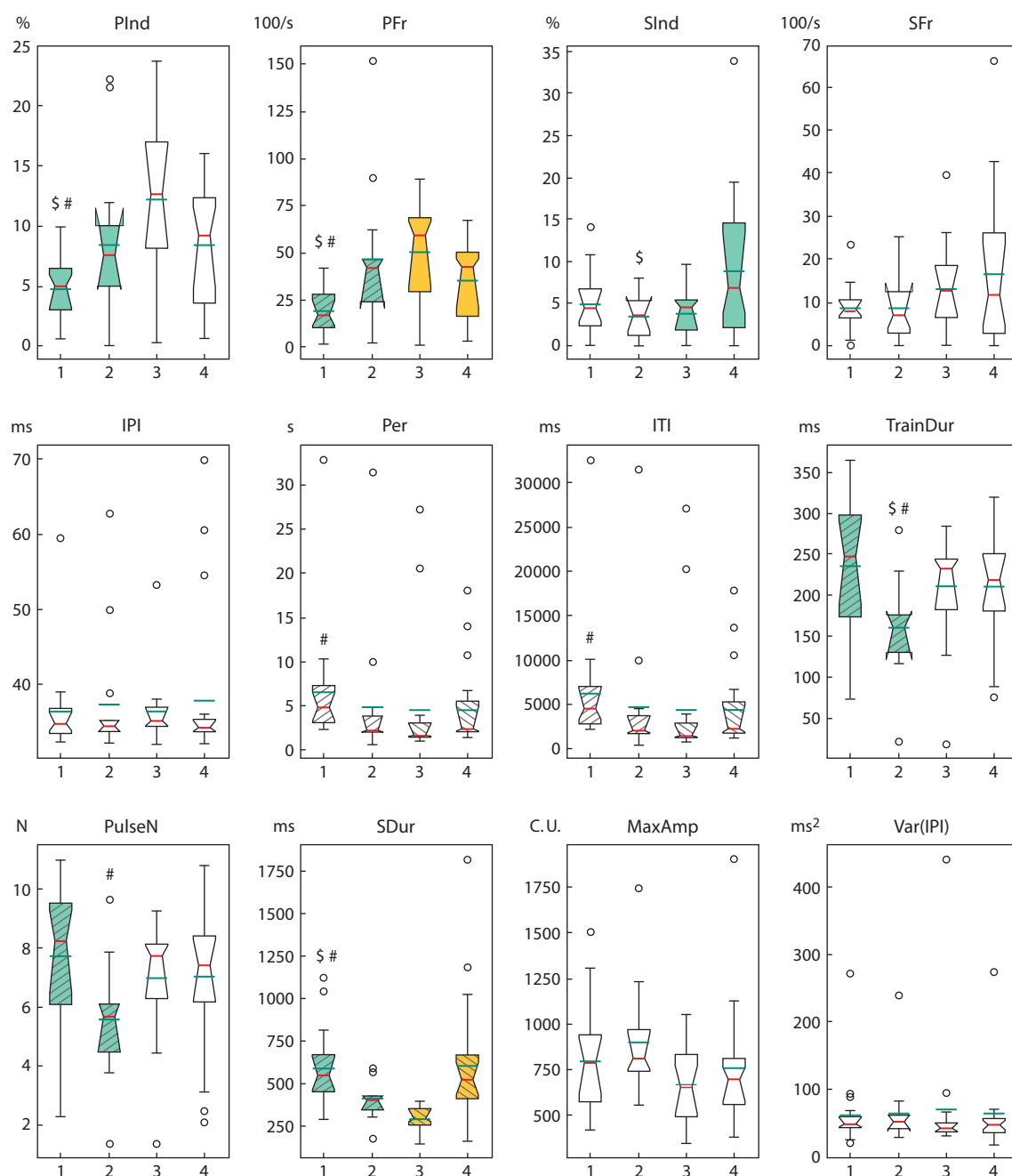


Fig. 6. Courtship song parameters in *Drosophila* hybrids with neuron type-specific *limk1* interference.

Hybrid numbers: 1. 6793 > *limk1*-KD; 2. 6793 > *limk1*+" (CHN); 3. 30027 > *limk1*-KD; 4. 30027 > *limk1*+" (FRN). Statistical differences: hybrids with *limk1* interference vs control – the pairs with difference are shown by color (two-sided randomization test, $p < 0.05$) or hatching (two-sided Mann–Whitney test, $p < 0.05$); hybrids with CHN driver vs hybrids with FRN driver: \$ two-sided randomization test; # two-sided Mann–Whitney test. For hybrids 1, 2, 3, 4, respectively: $n = 20, 15, 17, 22$ for pulse song parameters; $n = 18, 13, 15, 20$ for sine song parameters. Median is shown by the red line, the mean value is shown by the green line.

effect of LIMK1 and cofilin activity on memory processes. It was crucial to check the behavioral effects of *Drosophila limk1* suppression in specific types of neurons.

Using paraffin section staining, both LIMK1 and its product p-cofilin were shown to be homogeneously distributed in the brain neuropil, with maximum level in CC (Lopatina et al., 2007). Our results of the confocal microscopy analysis gave a different picture of LIMK1 distribution, quite similar for all the studied strains. We have shown a specific LIMK1 decrease

in MB, which is responsible for associative learning, as well as in CC, involved in higher movement control (Strauss, Heisenberg, 1993). This puts under question the role of LIMK1 in the aforementioned processes. However, LIMK1 was present in the cell bodies and processes of DAN, which interact with MB and CC (Mao, Davis, 2009) and regulate memory and forgetting. The observed p-cofilin distribution resembled this for LIMK1: its level was low in the MB lobes and CC. The low level of p-cofilin in the MB lobes had been previously shown

(Abe et al., 2014). In contrast to LIMK1, p-cofilin level was low in Cal formed by PN and KC terminals and high in cell nuclei. The latter corresponds to its functioning in the cell, as cofilin phosphorylation is necessary for its translocation into the nucleus (Abe et al., 1993).

The effectiveness of *limk1* suppression at the RNA level was confirmed using Act-GAL4 activator in the whole *Drosophila* body. GAL4 was also active in specific brain areas of the corresponding strains. However, we failed to quantitatively check the changes of *limk1* expression in *Drosophila* UAS × GAL4 hybrids with neuronal-specific GAL4 expression. The decrease in LIMK1 level might be local or too small. *limk1* interference might also induce the compensatory activation of LIMK1 translation.

To study *limk1* knockdown effects on memory, we used CCSP modification applied by (Kamyshev et al., 1999): training was performed with the mated female. In this case, courtship learning results from the rise of sensitivity to the antiaphrodisiac cis-vaccenyl acetate (cVA) due to unsuccessful courtship. cVA is not required for learning, being necessary for memory performance. aSP13 DAN, which innervate the *fru*-positive tip of γ L, are necessary and sufficient for courtship learning (Keleman et al., 2012). 24 h memory consolidation requires the prolonged aSP13 stimulation and Orb2 dimerization in some γ neurons (Krüttner et al., 2015). α/β neurons are involved in LTM processes (Redt-Clouet et al., 2012; Jones et al., 2018). Hence, other DAN innervating α/β L of MB, including PAM and PPL1 cells (Aso et al., 2014a), may also be involved in LTM.

The behavioral differences were observed after *limk1* interference, e.g., the restoration of 3 h STM for *limk1-KD* > 6794 strain. GAL4 drivers themselves affected memory abilities, which were generally decreased compared to *CS*. The drivers also significantly affected the forgetting curves. Thus, we studied the effects of *limk1* interference relative to a control strain with the same GAL4 driver. We applied two different crossing schemes – UAS (*f*) > 6794 (*m*) (for 3 h STM and LTM analysis) and reverse (in the other behavioral experiments). In the first case, the control UAS > *limk1*“+” hybrid had bright eyes due to *v[1]* recessive allele, in contrast to UAS > *limk1-KD* hybrid with the wild type dark red eyes. The observed 3 h STM differences are unlikely to be associated with the differences in eyes pigmentation, as *v[1]* flies showed a normal 3 h STM and 2 day LTM in CCSP (Nikitina et al., 2021), while both forms of memory were impaired in the control strain. However, memory retention depends on parent affect, with some paternal epigenetic factors affecting STM strength (Medvedeva et al., 2021). For 6794 > *limk1-KD* strain, we did not see STM difference from the control strain, though learning ability slightly increased after *limk1* knockdown (see Fig. 5). Thus, when studying LIMK1 effects on learning and memory, it is necessary to consider the crossing direction.

Acetylcholine is the major excitatory neurotransmitter in *Drosophila*. Among CHN are: PN forming synapses on KC of MB (Yasuyama et al., 2002), the MB intrinsic neurons that are responsible for olfactory memory, expressing ChAT and VAcHT (Barnstedt et al., 2016), and the α/β core neurons required for LTM consolidation (Yi et al., 2013). In the hybrids with 6793 driver (GAL4 expressed in CHN), GFP level was

specifically high in α/β L compared to the other MB lobes. Here, *limk1* interference resulted in faster STM forgetting. This contradicts the cofilin role in active forgetting shown in OAVL, where cofilin was proposed to be regulated by LIMK1 (Shuai, Zhong, 2010). The involvement of LIMK1 and cofilin in forgetting may occur locally, within specific neuronal populations or synaptic terminals. At the same time, LIMK1 may be crucial for memory storage and retrieval in CCSP. The glutamatergic MBON M6 neurons serve for STM output: aSP13 DAN prolongs potentiation of γ L – M6 synapses (Zhao et al., 2018). Some cholinergic MBON appeared to regulate the *Drosophila* visual appetitive memory (Aso et al., 2014b). As the extrinsic MB cells responsible for CCSP memory were similar to those used for appetitive memory (Montague, Baker, 2016), the decrease in 60 min STM might occur due to *limk1* suppression in some of these neurons.

The hybrids with 7009 driver (DAN and SRN) showed generally low CI values and negative LI values 24 h after learning. Males of these strains had pale pink eyes because of defects of eyes pigmentation, due to non-complete *w[1118]* rescue. *w[1118]* males demonstrated low courtship activity and success, presumably due to some defects of sexual development and maturation (Xiao et al., 2017). However, the control 7009 > *limk1*“+” strain had normal LI up to 60 min after training. *limk1* knockdown by 7009 driver was associated with dramatic defects of learning and memory: LI just after training did not statistically differ from zero. Thus, LIMK1-dependent signaling in DAN and SRN seems to be important for learning and memory in CCSP.

limk1 knockdown by 30027 driver (FRN) decreased the forgetting rate in the time interval 30–60 min. This corresponds to the role of actin-remodeling pathway in forgetting in OAVL paradigm (Shuai et al., 2010). LI of the control strain did not differ from zero starting from 30 min after learning, while *limk1* knockdown increased it. In males, FRN are responsible for courtship behavior. There are ~1500 FRN in the *Drosophila* brain, including sensory organs, lateral horn, lateral protocerebrum, SMP arch and motor control centers. Together they provide multisensory integration to regulate the male courtship process (Yu et al., 2010; Liu et al., 2019). Some CHN and DAN are also *Fru*-positive, such as ~300 γ L neurons and aSP13 DAN located in SMP, which regulates courtship learning and memory. The activity of *fru* gene was reported to decrease upon LTM formation in CCSP (Winbush et al., 2012). Hence, suppression of some FRN activity may be associated with memory prolongation and consolidation.

In addition to memory processes, *limk1* interference affected some parameters of the male courtship song. As well as for courtship memory, we observed the opposite functional effects of *limk1* knockdown in FRN and CHN. FRN of the P1 class initiate *Drosophila* courtship behavior and trigger courtship song. pIP10 neurons possibly convey the P1 signal to thoracic dPR1 and vPR6 neurons, proposed to be the parts of a central pattern generator (CPG), which defines the time and shape of the pulse song. vPR6 possibly encode IPI (von Philipsborn et al., 2011). Pulse and sine CPG either contain FRN or interact with them. As sine and pulse song normally do not overlap, the mutually inhibitory mechanisms must exist, switching

between quasilinear and relaxation modes of oscillation for sine and pulse song, respectively. Some descending interneurons may control the type of the song, while the others trigger singing or terminate the song (Clyne, Miesenböck, 2008).

Indeed, we observed the opposite changes of PInd/PFr and SInd/SDur upon *limk1* interference in CHN and FRN, moving the balance toward the sine and pulse song, respectively. The increase in PFr after *limk1* knockdown in FRN might indicate the negative role of LIMK1-dependent signaling on activity of the pulse CPG or the upstream brain centers, which switch them from active to silent mode. CC is important for control of stability of pacemakers, which regulate the rhythmic structure of courtship song. PB destruction leads to sound signal distortions, FB and EB destruction additionally decreases sine and pulse trains (Popov et al., 2004). CC includes a large number of neuronal types, such as CHN, DAN, SRN, and others. CHN are present in FB, EB, No and PB (Kahsai, Winther, 2011), similarly to what we observed in our research. Hence, they probably play some role in regulation of male singing. The opposite effects of *limk1* interference in CHN and FRN may indicate a specific role of LIMK1 in courtship controlling network, whereas the other parts of the brain possibly have a total antagonistic effects on its activity. Alternatively, CHN and FRN *fru* neurons may differ in some aspects of regulation of LIMK1-dependent signaling pathway.

Conclusion

In summary, we have shown that effects of *limk1* interference in *Drosophila* male courtship memory and song depend on both the neuronal type and specific behavioral parameter. *limk1* interference in CHN and FRN had generally opposite effects, whereas its suppression in DAN and SRN impaired the flies' ability to learn. Using activator strains with a narrower pattern of GAL4 expression would help to better localize the brain structures, where LIMK1 regulates memory and forgetting in CCSP. Among such putative structures are γ L and aSP13 DAN innervating γ 5 area, as well as other DAN participating in memory formation, consolidation and retrieval. Studying the behavioral consequences of *limk1* overexpression in different brain areas will complement the estimates of the effects of its suppression. The above investigation should also focus on LIMK1 partner proteins, such as cofilin in its active and phosphorylated form.

References

- Abe H., Nagaoka R., Obinata T. Cytoplasmic localization and nuclear transport of cofilin in cultured myotubes. *Exp. Cell Res.* 1993; 206(1):1-10. DOI 10.1006/excr.1993.1113.
- Abe T., Yamazaki D., Murakami S., Hiroi M., Nitta Y., Maeyama Y., Tabata T. The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. *Development.* 2014;141(24):4716-4728. DOI 10.1242/dev.113308.
- Albin S.D., Kaun K.R., Knapp J.M., Chung P., Heberlein U., Simpson J.H. A subset of serotonergic neurons evokes hunger in adult *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2015;25(18):2435-2440. DOI 10.1016/j.cub.2015.08.005.
- Aso Y., Grübel K., Busch S., Friedrich A.B., Siwanowicz I., Tanimoto H. The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J. Neurogenet.* 2009;23(1-2):156-172. DOI 10.1080/01677060802471718.
- Aso Y., Hattori D., Yu Y., Johnston R.M., Iyer N.A., Ngo T.B., Dionne H., Abbott L.F., Axel R., Tanimoto H., Rubin G.M. The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife.* 2014a;3:e04577. DOI 10.7554/eLife.04577.
- Aso Y., Sitaraman D., Ichinose T., Kaun K.R., Vogt K., Belliart-Guérin G., Plaças P., Robie A.A., Yamagata N., Schnaitmann C., Rowell W.J., Johnston R.M., Ngo T.B., Chen N., Korff W., Nita-bach M.N., Heberlein U., Preat T., Branson K.M., Tanimoto H., Rubin G.M. Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife.* 2014b; 3:e04580. DOI 10.7554/eLife.04580.
- Barnstedt O., Oswald D., Felsenberg J., Brain R., Moszynski J.P., Talbot C.B., Perrat P.N., Waddell S. Memory-relevant mushroom body output synapses are cholinergic. *Neuron.* 2016;89(6):1237-1247. DOI 10.1016/j.neuron.2016.02.015.
- Ben Zablah Y., Zhang H., Gugustea R., Jia Z. LIM-kinases in synaptic plasticity, memory, and brain diseases. *Cells.* 2021;10(8):2079-2103. DOI 10.3390/cells10082079.
- Berry J.A., Cervantes-Sandoval I., Nicholas E.P., Davis R.L. Dopamine is required for learning and forgetting in *Drosophila*. *Neuron.* 2012;74(3):530-542. DOI 10.1016/j.neuron.2012.04.007.
- Berry J.A., Phan A., Davis R.L. Dopamine neurons mediate learning and forgetting through bidirectional modulation of a memory trace. *Cell Rep.* 2018;25(3):651-662. DOI 10.1016/j.celrep.2018.09.051.
- Cervantes-Sandoval I., Chakraborty M., MacMullen C., Davis R.L. Scribble scaffolds a signalosome for active forgetting. *Neuron.* 2016;90(6):1230-1242. DOI 10.1016/j.neuron.2016.05.010.
- Clyne J.D., Miesenböck G. Sex-specific control and tuning of the pattern generator for courtship song in *Drosophila*. *Cell.* 2008;133(2):354-363. DOI 10.1016/j.cell.2008.01.050.
- Cook K.R., Parks A.L., Jacobus L.M., Kaufman T.C., Matthews K.A. New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. *Fly (Austin).* 2010;4(1):88-91. DOI 10.4161/fly.4.1.11230.
- Cuberos H., Vallée B., Vourc'h P., Tastet J., Andres C.R., Bénédicti H. Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction. *FEBS Lett.* 2015;589(24 Pt.B):3795-3806. DOI 10.1016/j.febslet.2015.10.032.
- Davis R.L., Zhong Y. The biology of forgetting – a perspective. *Neuron.* 2017;95(3):490-503. DOI 10.1016/j.neuron.2017.05.039.
- Duffy J.B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 2002;34(1-2):1-15. DOI 10.1002/gene.10150.
- Gao Y., Shuai Y., Zhang X., Peng Y., Wang L., He J., Zhong Y., Li Q. Genetic dissection of active forgetting in labile and consolidated memories in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(42):21191-21197. DOI 10.1073/pnas.1903763116.
- Hartenstein V. Morphological diversity and development of glia in *Drosophila*. *Glia.* 2011;59(9):1237-1252. DOI 10.1002/glia.21162.
- Iliadi K.G., Kamyshev N.G., Popov A.V., Iliadi N.N., Rashkovets-kaya E.L., Nevo E., Korol A.B. Peculiarities of the courtship song in the *Drosophila melanogaster* populations adapted to gradient of microecological conditions. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2009;45(5):579-588. DOI 10.1134/S0022093009050041.
- Jones S.G., Nixon K.C.J., Chubak M.C., Kramer J.M. Mushroom body specific transcriptome analysis reveals dynamic regulation of learning and memory genes after acquisition of long-term courtship memory in *Drosophila*. *G3: Genes Genomes Genetics (Bethesda).* 2018;8(11):3433-3446. DOI 10.1534/g3.118.200560.
- Kahsai L., Winther A.M. Chemical neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: distribution of multiple neuropeptides in relation to neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* 2011;519(2):290-315. DOI 10.1002/cne.22520.
- Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. *Learn. Mem.* 1999;6(1):1-20.
- Kasture A.S., Hummel T., Sucic S., Freissmuth M. Big lessons from tiny flies: *Drosophila melanogaster* as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(6):1788-1805. DOI 10.3390/ijms19061788.

- Keleman K., Vrontou E., Krüttner S., Yu J.Y., Kurtovic-Kozaric A., Dickson B.J. Dopamine neurons modulate pheromone responses in *Drosophila* courtship learning. *Nature*. 2012;489(7414):145-149. DOI 10.1038/nature11345.
- Krüttner S., Traummüller L., Dag U., Jandrasits K., Stepien B., Iyer N., Fradkin L.G., Noordermeer J.N., Mensh B.D., Keleman K. Synaptic Orb2A bridges memory acquisition and late memory consolidation in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2015;11(12):1953-1965. DOI 10.1016/j.celrep.2015.05.037.
- Liu W., Ganguly A., Huang J., Wang Y., Ni J.D., Gurav A.S., Aguilera M.A., Montell C. Neuropeptide F regulates courtship in *Drosophila* through a male-specific neuronal circuit. *eLife*. 2019;8:1-29. DOI 10.7554/eLife.49574.
- Lopatina N.G., Zachevilo T.G., Chesnokova E.G., Savvateeva-Popova E.V. Mutations in structural genes of tryptophan metabolic enzymes of the kynurenine pathway modulate some units of the L-glutamate receptor – actin cytoskeleton signaling cascade. *Russ. J. Genet.* 2007;43(10):1168-1172. DOI 10.1134/S1022795407100110.
- Mao Z., Davis R.L. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front. Neural Circuits*. 2009;3:1-17. DOI 10.3389/neuro.04.005.2009.
- Mazzoni D., Dannenberg R. Audacity®. Audacity Team, 2020. URL: <https://audacityteam.org>. Last access: 05.12.2021.
- Medina J.H. Neural, cellular and molecular mechanisms of active forgetting. *Front. Syst. Neurosci.* 2018;12:1-10. DOI 10.3389/fnsys.2018.00003.
- Medvedeva A.V., Molotkov D.A., Nikitina E.A., Popov A.V., Karagodin D.A., Baricheva E.M., Savvateeva-Popova E.V. Systemic regulation of genetic and cytogenetic processes by a signal cascade of actin remodeling: locus agnostic in *Drosophila*. *Russ. J. Genet.* 2008;44(6):669-681. DOI 10.1134/S1022795408060069.
- Medvedeva A.V., Tokmatcheva E.V., Kaminskaya A.N., Vasileva S.A., Nikitina E.A., Zhuravlev A.V., Zakharov G.A., Zatepina O.G., Savvateeva-Popova E.V. Parent-of-origin effects on nuclear chromatin organization and behavior in a *Drosophila* model for Williams–Beuren Syndrome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(5):472-485. DOI 10.18699/VJ21.054.
- Montague S.A., Baker B.S. Memory elicited by courtship conditioning requires mushroom body neuronal subsets similar to those utilized in appetitive memory. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164516. DOI 10.1371/journal.pone.0164516.
- Ng J., Luo L. Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron*. 2004;44(5):779-793. DOI 10.1016/j.neuron.2004.11.014.
- Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Zakharov G.A., Savvateeva-Popova E.V. The *Drosophila* agnostic locus: involvement in the formation of cognitive defects in Williams syndrome. *Acta Naturae*. 2014;6(2):53-61. DOI 10.32607/20758251-2014-6-2-53-61.
- Nikitina E.A., Zhuravlev A.V., Savvateeva-Popova E.V. Effect of impaired kynurenine synthesis on memory in *Drosophila*. *Integrativnaya Fiziologiya* = *Integrative Physiology*. 2021;2(1):49-60. DOI 10.33910/2687-1270-2021-2-1-49-60. (in Russian)
- Okamoto N., Nishimura T. Signaling from glia and cholinergic neurons controls nutrient-dependent production of an insulin-like peptide for *Drosophila* body growth. *Dev. Cell*. 2015;35(3):295-310. DOI 10.1016/j.devcel.2015.10.003.
- Popov A.V., Peresleni A.I., Savvateeva-Popova E.V., Vol'f R., Heisenberg M. The role of the mushroom bodies and of the central complex of *Drosophila melanogaster* brain in the organization of courtship behavior and communicative sound production. *J. Evol. Biochem. Phys.* 2004;40:641-652. DOI 10.1007/s10893-004-0005-z.
- Redt-Clouet C., Trannoy S., Boulanger A., Tokmatcheva E., Savvateeva-Popova E., Parmentier M.L., Preat T., Dura J.M. Mushroom body neuronal remodeling is necessary for short-term but not for long-term courtship memory in *Drosophila*. *Eur. J. Neurosci.* 2012;35(11):1684-1691. DOI 10.1111/j.1460-9568.2012.08103.x.
- Ritchie M.G., Yate V.H., Kyriacou C.P. Genetic variability of the inter-pulse interval of courtship song among some European populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity (Edinb)*. 1994;72(Pt.5):459-464. DOI 10.1038/hdy.1994.64.
- Salvaterra P.M., Kitamoto T. *Drosophila* cholinergic neurons and processes visualized with Gal4/UAS-GFP. *Brain Res. Gene Expr. Patterns*. 2001;1(1):73-82. DOI 10.1016/S1567-133X(01)00011-4.
- Savvateeva-Popova E.V., Popov A.V., Grossman A., Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Peresleni A.I., Molotkov D.A., Kamyshev N.G., Pyatkov K.I., Zatepina O.G., Schostak N., Zelentsova E.S., Pavlova G., Panteleev D., Riederer P., Evgen'ev M.B. Non-coding RNA as a trigger of neuropathologic disorder phenotypes in transgenic *Drosophila*. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2008;115(12):1629-1642. DOI 10.1007/s00702-008-0078-8.
- Savvateeva-Popova E.V., Popov A.V., Heinemann T., Riederer P. *Drosophila* mutants of the kynurenine pathway as a model for ageing studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003;527:713-722. DOI 10.1007/978-1-4615-0135-0_84.
- Savvateeva-Popova E.V., Zhuravlev A.V., Brázda V., Zakharov G.A., Kaminskaya A.N., Medvedeva A.V., Nikitina E.A., Tokmatcheva E.V., Dolgaya J.F., Kulikova D.A., Zatepina O.G., Funikov S.Y., Ryazansky S.S., Evgen'ev M.B. *Drosophila* model for the analysis of genesis of LIM-kinase 1-dependent Williams–Beuren syndrome cognitive phenotypes: INDELs, transposable elements of the Tc1/mariner superfamily and microRNAs. *Front. Genet.* 2017;8:123. DOI 10.3389/fgene.2017.00123.
- Shuai Y., Lu B., Hu Y., Wang L., Sun K., Zhong Y. Forgetting is regulated through Rac activity in *Drosophila*. *Cell*. 2010;140(4):579-589. DOI 10.1016/j.cell.2009.12.044.
- Shuai Y., Zhong Y. Forgetting and small G protein Rac. *Protein Cell*. 2010;1(6):503-506. DOI 10.1007/s13238-010-0077-z.
- Siegel R.W., Hall J.C. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(7):3430-3434. DOI 10.1073/pnas.76.7.343.
- Strauss R., Heisenberg M. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* 1993;13(5):1852-1861. DOI 10.1523/JNEUROSCI.13-05-01852.1993.
- Sun B., Xu P., Salvaterra P.M. Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(18):10438-10443. DOI 10.1073/pnas.96.18.10438.
- Thapa A., Sullivan S.M., Nguyen M.Q., Buckley D., Ngo V.T., Dada A.O., Blankinship E., Cloud V., Mohan R.D. Brief freezing steps lead to robust immunofluorescence in the *Drosophila* nervous system. *Biotechniques*. 2019;67(6):299-305. DOI 10.2144/btn-2018-0067.
- Tully T., Preat T., Boynton S.C., Vecchio M.D. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*. 1994;79(1):35-47. DOI 10.1016/0092-8674(94)90398-0.
- Virtual Fly Brain. URL: <https://v2.virtualflybrain.org>. Last access: 01.12.2021.
- von Philipsborn A.C., Liu T., Yu J.Y., Masser C., Bidaye S.S., Dickson B.J. Neuronal control of *Drosophila* courtship song. *Neuron*. 2011;69(3):509-522. DOI 10.1016/j.neuron.2011.01.011.
- Winbush A., Reed D., Chang P.L., Nuzhdin S.V., Lyons L.C., Arbeitman M.N. Identification of gene expression changes associated with long-term memory of courtship rejection in *Drosophila* males. *G3: Genes Genomes Genetics (Bethesda)*. 2012;2(11):1437-1445. DOI 10.1534/g3.112.004119.
- Xiao C., Qiu S., Robertson R.M. The white gene controls copulation success in *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7712-7725. DOI 10.1038/s41598-017-08155-y.
- Yasuyama K., Meinertzhagen I.A., Schürmann F.W. Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 2002;445(3):211-226. DOI 10.1002/cne.10155.
- Yi W., Zhang Y., Tian Y., Guo J., Li Y., Guo A. A subset of cholinergic mushroom body neurons requires Go signaling to regulate sleep in *Drosophila*. *Sleep*. 2013;36:1809-1821. DOI 10.5665/sleep.3206.

- Yu J.Y., Kanai M.I., Demir E., Jefferis G.S., Dickson B.J. Cellular organization of the neural circuit that drives *Drosophila* courtship behavior. *Curr. Biol.* 2010;20(18):1602-1614. DOI 10.1016/j.cub.2010.08.025.
- Zalomaeva E.S., Falina V.S., Medvedeva A.V., Nikitina E.A., Savvateeva-Popova E.V. Learning and forgetting in *Drosophila melanogaster* in *limk1* gene polymorphism. *Integrativnyaya Fiziologiya = Integrative Physiology.* 2021;2(3):318-327. DOI 10.33910/2687-1270-2021-2-3-318-327. (in Russian)
- Zhang X., Li Q., Wang L., Liu Z.J., Zhong Y. Cdc42-dependent forgetting regulates repetition effect in prolonging memory retention. *Cell Rep.* 2016;16(3):817-825. DOI 10.1016/j.celrep.2016.06.041.
- Zhao X., Lenek D., Dag U., Dickson B.J., Keleman K. Persistent activity in a recurrent circuit underlies courtship memory in *Drosophila*. *eLife.* 2018;7:1-16. DOI 10.7554/eLife.31425.
- Zhuravlev A.V., Shchegolev B.F., Zakharov G.A., Ivanova P.N., Nikitina E.A., Savvateeva-Popova E.V. 3-Hydroxykynurenine as a potential ligand for Hsp70 proteins and its effects on *Drosophila* memory after heat shock. *Mol. Neurobiol.* 2022;59(3):1862-1871. DOI 10.1007/s12035-021-02704-3.
- Zhuravlev A.V., Vetrovoy O.V., Ivanova P.N., Savvateeva-Popova E.V. 3-Hydroxykynurenine in regulation of *Drosophila* behavior: the novel mechanisms for cardinal phenotype manifestations. *Front. Physiol.* 2020;11:971. DOI 10.3389/fphys.2020.00971.

ORCID ID

A.V. Zhuravlev orcid.org/0000-0003-2673-4283
E.S. Zalomayeva orcid.org/0000-0002-6005-3433
E.S. Egozova orcid.org/0000-0002-0055-3778

A.D. Emelin orcid.org/0000-0002-8498-9017
V.V. Sokurova orcid.org/0000-0003-0821-9974
E.A. Nikitina orcid.org/0000-0003-1897-8392
E.V. Savvateeva-Popova orcid.org/0000-0002-6925-4370

Acknowledgements. This research was funded by the Russian Foundation for Basic Research (No. 20-015-00300 A). We thank Prof. E. Buchner (Institute of Clinical Neurobiology, Würzburg) for *Drosophila* anti-CSP antibodies. We also thank the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) at Indiana University (USA) and TRiP at Harvard Medical School (NIH/NIGMS R01-GM084947) for providing us with transgenic GAL4 and UAS fly stocks. This study was supported by the State Program 47 GP "Scientific and Technological Development of the Russian Federation" (2019–2030), theme 0134-2019-0004.

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

Received June 9, 2022. Revised August 19, 2022. Accepted August 24, 2022.

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

О природе пикобирнавирусов

А.Ю. Кашников , Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова

Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора,
Нижний Новгород, Россия

 a.kashn@yandex.ru

Аннотация. Считается, что пикобирнавирусы (*Picobirnaviridae*, *Picobirnavirus*, ПБВ) являются вирусами животных, так как их обычно находят в образцах стула животных. Однако до сих пор не найдена модель животного или клеточная культура для их размножения. В 2018 г. было выдвинуто и экспериментально обосновано гипотетическое предположение о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот. Эта гипотеза основана на присутствии в геноме всех ПБВ перед тремя открытыми рамками считывания (ORF) в сайте связывания с рибосомой последовательностей Шайна–Дальгарно, которыми насыщен геном прокариот, тогда как в геноме эукариот такие участки встречаются с низкой частотой. Насыщенность генома последовательностями Шайна–Дальгарно, а также сохранение такой насыщенности у потомства, по мнению ученых, позволяет отнести ПБВ к вирусам прокариот. В то же время существует вероятность принадлежности ПБВ к вирусам эукариотических хозяев – грибов или беспозвоночных, поскольку были обнаружены ПБВ-подобные последовательности, сходные с геномом вирусов грибов из семейств митовирусов и партитивирусов. В связи с этим возникло представление, что по способу репродукции ПБВ напоминают вирусы грибов. Расхождение во взглядах на истинного хозяина (хозяев) ПБВ вызвало дискуссию среди ученых и потребовало дальнейших исследований для выяснения их природы. В обзоре освещены результаты исследований по поиску хозяина ПБВ. Проанализированы причины появления среди множества характерных для ПБВ последовательностей генома атипичных последовательностей, использующих для трансляции вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) вместо стандартного генетического кода альтернативный митохондриальный код низших эукариот (грибов и беспозвоночных). Цель обзора состояла в сборе аргументов в поддержку гипотезы, полагающей фаговую природу ПБВ и поиск наиболее реалистичного объяснения причин выявления нестандартных для ПБВ геномных последовательностей. Опираясь на гипотезу о генеалогическом родстве ПБВ с РНК-вирусами из других семейств со сходным сегментированным геномом, такими как *Reoviridae*, *Cystoviridae*, *Totiviridae* и *Partitiviridae*, вирусологи поддерживают предположение о решающей роли в происхождении атипичных ПБВ-подобных штаммов реассортации между ПБВ и вирусами перечисленных семейств. Собранные аргументы свидетельствуют о большой вероятности фаговой природы у ПБВ. Представленные в обзоре данные свидетельствуют, что принадлежность ПБВ-подобного потомства к вирусам прокариот или эукариот определяется не только степенью насыщения его генома прокариотическим мотивом, стандартным или митохондриальным генетическим кодом. Решающим фактором может являться также первичная структура гена, кодирующего белок вирусного капсида, отвечающего за наличие или отсутствие специфических протеолитических свойств у вируса, определяющих его способность к самостоятельному горизонтальному распространению в новые клетки.

Ключевые слова: пикобирнавирус; сегмент генома; клетка-хозяин; митохондриальный генетический код; филогенетическое дерево; реассортация.

Для цитирования: Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. О природе пикобирнавирусов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):264-275. DOI 10.18699/VJGB-23-32

On the nature of picobirnaviruses

A.Yu. Kashnikov , N.V. Epifanova, N.A. Novikova

I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

 a.kashn@yandex.ru

Abstract. The picobirnaviruses (*Picobirnaviridae*, *Picobirnavirus*, PBVs) are currently thought to be animal viruses, as they are usually found in animal stool samples. However, no animal model or cell culture for their propagation has yet been found. In 2018, a hypothetical assumption about PBVs belonging to prokaryotic viruses was put forward and experimentally substantiated. This hypothesis is based on the presence of Shine–Dalgarno sequences in the genome of all PBVs before three reading frames (ORF) at the ribosomal binding site, with which the prokaryotic genome is saturated, while in the eukaryotic genome such regions occur with low frequency. The genome saturation with the Shine–Dalgarno sequences, as well as the preservation of this saturation in the progeny, according to scientists, allows us to attribute PBVs to prokaryotic viruses. On the other hand, there is a possibility that PBVs belong to viruses of eukaryotic hosts – fungi or invertebrates, since PBV-like sequences similar to the genome of fungal viruses from the families of mitoviruses and partitiviruses have been identified. In this regard, the idea arose that, in terms of reproduction

mode, PBVs resemble fungal viruses. The divergence of views on the true PBV host(s) has sparked discussions among scientists and required further research to elucidate their nature. The review highlights the results of the search for a PBV host. The reasons for the occurrence of atypical sequences among the PBV genome sequences that use an alternative mitochondrial code of lower eukaryotes (fungi and invertebrates) for the translation of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) instead of the standard genetic code are analyzed. The purpose of the review was to collect arguments in support of the hypothesis about the phage nature of PBVs and to find the most realistic explanation of the reasons for identifying non-standard genomic sequences for PBVs. Based on the hypothesis about the genealogical relationship of PBVs with RNA viruses from other families with similar segmented genomes, such as *Reoviridae*, *Cystoviridae*, *Totiviridae* and *Partitiviridae*, virologists support the assumption of a decisive role in the origin of atypical PBV-like reassortment strains between PBVs and viruses of the listed families. The collected arguments given in this review indicate a high probability of a phage nature of PBVs. The data presented in the review show that the belonging of PBV-like progeny to prokaryotic or eukaryotic viruses is determined not only by its genome saturation level with a prokaryotic motif, standard or mitochondrial genetic code. The primary structure of the gene encoding the viral capsid protein responsible for the presence or absence of specific proteolytic properties of the virus that determine its ability for independent horizontal transmission into new cells may also be a decisive factor.

Key words: picobirnavirus; genome segment; host cell; mitochondrial genetic code; phylogenetic tree; reassortment.

For citation: Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Novikova N.A. On the nature of picobirnaviruses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):264-275. DOI 10.18699/VJGB-23-32

Введение

Пикобирнавирусы (ПБВ) – это мелкие безоболочечные вирусы с бисегментированным двуцепочечным РНК-геномом, которые были обнаружены у самых разных видов животных, включая беспозвоночных, а также в образцах окружающей среды. Их находили в содержимом кишечника у людей и животных с диареей и без нее, вследствие чего ПБВ считались условно-патогенными кишечными вирусами млекопитающих и птиц. Однако культура клеток животных или животное-гнотобиот, где мог бы размножаться этот вирус, до сих пор не подобраны. Данный факт заставил некоторых исследователей усомниться в принадлежности пикобирнавирусов к вирусам эукариот. Индийские ученые S.R. Krishnamurthy и D. Wang (2018) проанализировали большое число полноразмерных (почти полноразмерных) геномных последовательностей ПБВ, обнаруженных в фекалиях людей, животных и образцах окружающей среды. В результате в геноме ПБВ были выявлены прокариотические мотивы (участки), расположенные перед открытыми рамками считывания в сайте связывания с рибосомой. На основании полученных данных выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот – бактериофагам (Krishnamurthy, Wang, 2018), которая в дальнейшем была подкреплена рядом других исследований (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Kleymann et al., 2020).

С другой стороны, после обнаружения новых ПБВ-подобных нуклеотидных последовательностей, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу, но использующих для трансляции альтернативный (нестандартный) митохондриальный генетический код (плесени или беспозвоночных животных), было высказано предположение, что ПБВ могут быть грибковыми вирусами со способом репродукции, напоминающим таковой у митовирусов (Yinda et al., 2019; Kleymann et al., 2020).

Эти противоречия, вызвавшие дискуссию среди ученых по вопросу о природе истинного хозяина (хозяев) ПБВ, может разрешить гипотеза, выдвинутая в 2018 г. Y.I. Wolf с коллегами (Wolf et al., 2018) и поддержанная другими исследователями (Chauhan et al., 2021). Данная гипотеза

объясняет происхождение аномальных штаммов ПБВ склонностью этих вирусов к резкой генетической модификации вследствие реассортации сегментов генома, описанной ранее (Conceição-Neto et al., 2016), и приобретением способности бактериофага к репродукции в клетках организма другой таксономической группы – низшего эукариота.

В настоящем обзоре проанализированы имеющиеся публикации, освещающие современные представления о происхождении и эволюции ПБВ, а также проведена дискуссия по вопросу о прокариотической или эукариотической природе их истинных хозяев. Цель работы состояла в сборе аргументов в поддержку гипотезы, полагающей фаговую природу ПБВ, и поиске наиболее реалистичного объяснения причин выявления нестандартных для ПБВ геномных последовательностей.

Характеристика ПБВ

Пикобирнавирусы – это безоболочечные вирусы с икосаэдрическим типом симметрии ($T = 2$), диаметром ~ 33 – 37 нм, принадлежащие к единственному роду *Picobirnavirus* в семействе *Picobirnaviridae* порядка *Diplohnnavirales*. Двуцепочечный (дц) РНК-геном ПБВ состоит из двух отдельных сегментов размерами 2525 и 1745 п. н. (рис. 1). Информация о структуре вириона и генома ПБВ, ареале распространения, связи с диареей, уровне экскреции, оппортунистическом (условно-патогенном) и зоонозном характере вируса, широком тканевом тропизме и генетической вариабельности приведена в обзорах (Ganesh et al., 2014; Кашников и др., 2020; Ghosh, Malik, 2021). Там же описаны способы амплификации, ПЦР-диагностики и секвенирования генома этих вирусов.

Используя филогенетический анализ на основе нуклеотидной последовательности гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), расположенного в сегменте 2 генома, исследователи делят ПБВ на пять геногрупп: GI, GII (Rosen et al., 2000), GIII (Smits et al., 2014), GIV и GV (Li et al., 2015), среди которых встречаются генетически вариабельные кластеры. Геногруппы GI и GII чаще встречаются в кластере ПБВ, выявляемых у позвоночных животных и человека. Геногруппа GIII была обнаружена

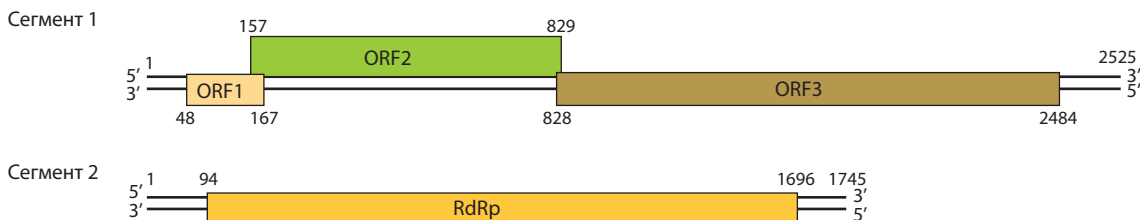


Рис. 1. Организация генома ПБВ человека (штамм Hu005102), относящегося к геногруппе I (Ghosh, Malik, 2021).

Сегмент 1 генома Hu005102 состоит из трех открытых рамок считывания (ORF) – ORF1, ORF2 и ORF3. Рамка ORF3 кодирует предшественник белка капсида вируса. Сегмент 2 имеет одну ORF, кодирующую вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp). Продукты ORF1 и ORF2 не идентифицированы.

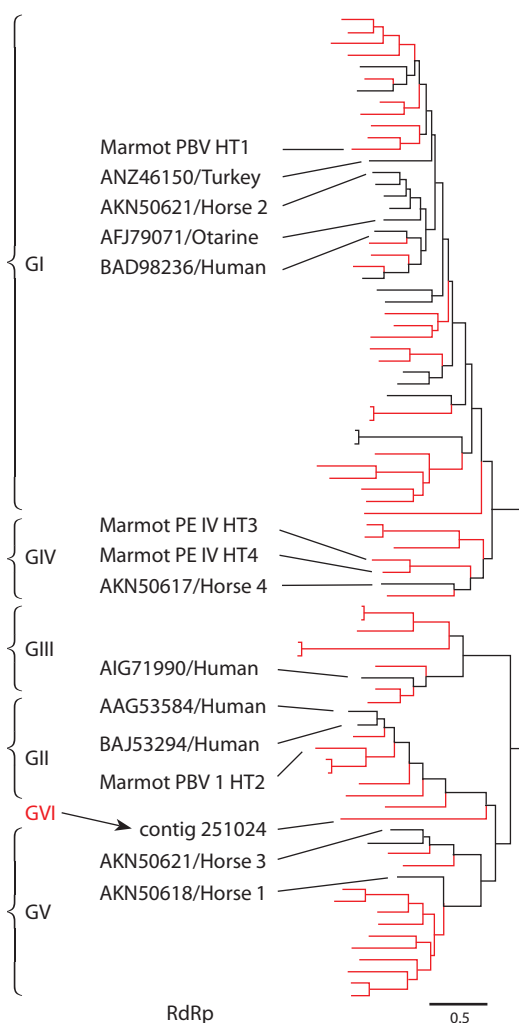


Рис. 2. Филогенетическое дерево, демонстрирующее наличие пяти предполагаемых геногрупп ПБВ, выявленных у сурка.

Построено на основе нуклеотидных последовательностей полного гена RdRp. Красным цветом обозначены последовательности геномов ПБВ сурка, черным – последовательности генома ПБВ от других хозяев (Luo et al., 2018, с модификациями).

у беспозвоночных (Shi et al., 2016), а GIV и GV выявлены в грибковых и прокариотических клетках-хозяевах (Knox et al., 2018). Все пять геногрупп ПБВ, найденные у одного хозяина (сурка), представлены на филограмме (рис. 2) в исследовании (Luo et al., 2018). Основными геногруппами ПБВ являются GI и GII, из которых наиболее распростра-

нены ПБВ геногруппы I (Shi et al., 2016; Kumar et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

Установлено, что ПБВ, относящиеся к одной RdRp-геногруппе, могут быть выявлены у принадлежащих разным видам предполагаемых хозяев. Также показано, что у «хозяина» одного вида обнаруживаются ПБВ разных геногрупп (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Woo et al., 2014, 2019; Li et al., 2015; Gallagher et al., 2017; Navarro et al., 2017; Boros et al., 2018; Duraisamy et al., 2018; Ghosh et al., 2018; Yinda et al., 2019; Joycelyn et al., 2020; Kleymann et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021). В то же время настоящий хозяин ПБВ до настоящего времени не определен. Среди высших эукариот не удалось подобрать ни культуру клеток, ни животных-гнотобионтов для успешного размножения вируса (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Delmas et al., 2019; Kleymann et al., 2020).

В дальнейшем, по мере изучения ПБВ, у исследователей появились сомнения по поводу того, что хозяевами этих вирусов могут являться клетки высших эукариот (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018). Недавно обнаружено, что от дцРНК-вирусов высших эукариот (*Reoviridae*) ПБВ отличаются не только архитектурой капсида, но и тем, что, предположительно, могут инфицировать прокариотические клетки (Knox et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018).

Гипотеза о фаговой природе ПБВ и связанные с ней противоречия

До появления гипотезы S.R. Krishnamurthy, D. Wang (2018) считалось, что ПБВ являются вирусами эукариот, так как их обнаруживали у самых разных видов животных, включая беспозвоночных. Поскольку ПБВ-подобные последовательности чаще всего находили в содержимом кишечника людей и животных с диареей или без нее, они считались условно-патогенными кишечными вирусами. Но виром кишечника у животных содержит не только эукариотические, но и прокариотические вирусы, которые обычно составляют наибольшую его долю (Yinda et al., 2018). Логично предположить, что ПБВ присутствуют не в клетках кишечника, а в его содержимом и могут быть прокариотическими вирусами микробиома кишечника (Adriaenssens et al., 2018; Kunz et al., 2018; Delmas et al., 2019; Bell et al., 2020; Guajardo-Leiva et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

В этом случае уровень выявления ПБВ должен соответствовать количеству бактерий, в которых они размножаются. В частности, в исследовании (Kleymann et al., 2020)

сообщалось о высоких показателях обнаружения (35.36 %, 29/82) ПБВ GI в образцах фекалий индийского мангуста на о. Сент-Китс (один из малых Антильских островов), что могло означать сосредоточение бактерий-хозяев ПБВ в данной местности. Причем наблюдалась разница частоты обнаружения ПБВ у мангустов из городской среды и диких мест обитания, которая составляла 33.33 % (19/57) и 40.00 % (10/25) соответственно и могла свидетельствовать о разнице в бактериальной нагрузке в этих местах.

Предположение, что ПБВ могут представлять собой вирусы прокариот, появилось, когда исследователи стали проводить анализ разнообразия полноразмерных (почти полноразмерных) последовательностей их генома. С помощью технологий секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением неспецифических праймеров удалось выявить некоторые особенности генома ПБВ, которые свидетельствуют, что эти вирусы на самом деле могут быть прокариотическими или грибовыми (Shi et al., 2016; Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018; Wolf et al., 2018; Yinda et al., 2018; Delmas et al., 2019; Kleymann et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

В 2018 г., анализируя разные эталонные геномы РНК-содержащих вирусов индивидуально и на уровне семейств, индийские ученые S.R. Krishnamurthy и D. Wang обнаружили в геноме ПБВ консервативные участки, называемые последовательностями Шайна–Дальгарно (Shine–Dalgarno sequence) или SD-последовательностями (Krishnamurthy, Wang, 2018). Такие участки присутствуют в геномах всех прокариотических и эукариотических вирусов и состоят, как правило, из шести нуклеотидов AGGAGG. Они расположены в 5'-нетранслируемой области перед открытыми рамками считывания (ORF) на расстоянии от 1 до 18 нуклеотидов (спейсерный участок) до стартового кодона (AUG), инициирующего трансляцию продуктов вирусного генома (Krishnamurthy, Wang, 2018; Ghosh, Malik, 2021). Функционально SD-последовательности являются сайтами связывания с рибосомой и служат для усиления эффективности трансляции вирусных белков.

Однако обогащение генома SD-последовательностями наблюдалось только в семействах вирусов, которые инфицируют прокариот, но не в семействах, инфицирующих эукариот. Это наблюдение позволило S.R. Krishnamurthy и D. Wang предположить, что высокая частота встречаемости SD-последовательностей в геномах вирусов может быть определяющим признаком прокариотического типа вируса и любые вирусные семейства, чьи геномы обогащены такими SD-участками, являются прокариотическими. Среди вирусов, инфицирующих прокариот, высоким содержанием SD-последовательностей обладают, например, некоторые бактериофаги семейства *Cystoviridae*, геном которых состоит из нескольких фрагментов дцРНК (Mindich, 1988; Boros et al., 2018).

В геноме ПБВ SD-последовательности присутствовали перед всеми ORF в сегментах 1 и 2. Уровень обогащения SD-участками у ПБВ был выше, чем у любого известного семейства прокариотических вирусов, и такой уровень отличался постоянством (у 100 % исследованных гено-

мов), в то время как не у всех прокариотических вирусов он сохраняется в процессе репродукции. Столь высокий уровень сохранения прокариотических участков в геноме ПБВ должен коррелировать с уровнем их сохранения в геноме бактерий определенного типа из спектра хозяев, которых могут заражать ПБВ. Этот уровень неодинаков в разных вирусных семействах (Krishnamurthy, Wang, 2018). Сохранение уровня обогащения прокариотическими участками в геномах вирусов прокариот зависит от того, сохраняет ли их в своих генах сама бактерия-хозяин. Известно, что не все виды бактерий сохраняют прокариотическую последовательность Шайна–Дальгарно в одинаковой степени. Например, в геноме бактерий, относящихся к типу *Firmicutes*, прокариотический мотив сохраняется более чем в 80 % генов, тогда как у *Bacteroides* – менее чем в 10 % (Omotajo et al., 2015). Известно, что разные семейства бактериальных РНК-вирусов могут состоять из эволюционно родственных вирусов, способных инфицировать один тип бактерий. Из этого факта следует, что ПБВ могут заражать бактерии в пределах типа *Firmicutes*, который по уровню сохранения прокариотического мотива в генах (более 80 %) более всего соответствует ПБВ и наиболее распространен в фекальной микробиоте (Sekelja et al., 2011).

Подтверждением гипотезы о фаговой природе ПБВ (Krishnamurthy, Wang, 2018) служат результаты, полученные другими учеными (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Kleymann et al., 2020). В частности, в работе (Boros et al., 2018) в геноме куриных ПБВ было выявлено присутствие SD-участков, которые располагались в сегменте 1 перед тремя ORF и в сегменте 2 перед ORF выше кодонов инициации. Исследователям с помощью мечения 6xHis и вестерн-блоттинга 1-го геномного сегмента ПБВ, содержащего SD-мотив, удалось *in vivo* выявить возможность его экспрессии и функционирования в *Escherichia coli* (Boros et al., 2018). Полученные результаты, по мнению авторов, служат доказательством существования бактериальной культуры для размножения ПБВ.

Предположение, что ПБВ представляют собой новое семейство РНК-бактериофагов с высоким уровнем геномного разнообразия, нашло подтверждение и в работе (Adriaenssens et al., 2018). Ее авторы обнаружили гексамерный прокариотический мотив AGGAGG в 100 % геномных последовательностей ПБВ, в то время как у вирусов эукариот из различных семейств SD-участки встречались с низкой частотой и в основном представляли собой тетрамеры (AGGA, GGAG, GAGG) (Adriaenssens et al., 2018). В обзоре (Ghosh, Malik, 2021) приведен ряд консервативных прокариотических SD-последовательностей (мотивов), обнаруженных перед всеми ORF в сегментах 1 и 2 ПБВ и ПБВ-подобных геномов с указанием расположения и с номерами доступа в GenBank.

Несмотря на полученные практические результаты, свидетельствующие о возможной принадлежности ПБВ к вирусам прокариот, многие авторы считают, что об окончательном доказательстве фаговой природы ПБВ говорить преждевременно (Ramesh et al., 2021). Еще не подобран хозяин, в котором бы ПБВ успешно размножались, а учитывая, что кишечный микробиом состоит из нескольких сотен в основном некультивируемых бактерий,

идентификация истинного бактериального или архейного хозяина ПБВ (если таковые имеются) будет сложной задачей (Boros et al., 2018).

Кроме того, в геноме некоторых штаммов ПБВ были обнаружены открытые рамки считывания (ORF), кодирующие ген RdRp, в которых при трансляции вместо ожидаемого стандартного генетического кода использовался альтернативный митохондриальный код грибов и беспозвоночных (Shi et al., 2016; Yinda et al., 2018, 2019; Kleymann et al., 2020). Так появилось предположение, что хозяевами ПБВ могут являться клетки низших эукариот.

ПБВ-подобные штаммы с нестандартным генетическим кодом

Как известно, последовательности генов в геномах вирусов имеют характерные для них консервативные участки – «мотивы», по которым вирусы идентифицируют. К характерным для ПБВ и ПБВ-подобных геномов мотивам относятся: прокариотический участок Шайна–Дальгарно AGGAGG (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Ghosh et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018; Yinda et al., 2018, 2019; Guajardo-Leiva et al., 2020; Joycelyn et al., 2020; Kleymann et al., 2020), концевые последовательности 5'-GUAAA и 3'-ACUGC (Ghosh et al., 2018; Delmas et al., 2019; Woo et al., 2019; Kleymann et al., 2020) и три участка, представленные в последовательностях аминокислот, – DFXXKFD, SGSGGT и GDD (Kleymann et al., 2020).

При трансляции гена RdRp большинства пикобирнавирусов используется стандартный генетический код. Однако недавно в образцах фекалий людей (Woo et al., 2019), мангустов (Kleymann et al., 2020), летучих мышей (Yinda et al., 2018) и беспозвоночных (Shi et al., 2016) были выявлены новые ПБВ-подобные последовательности гена RdRp с альтернативным (нестандартным) митохондриальным генетическим кодом. Митохондриальный код характерен для вирусов плесневых грибов и беспозвоночных. В частности, из содержимого кишечника летучих мышей было выделено пять ПБВ-подобных геномных последовательностей, состоящих из дцРНК с митохондриальным генетическим кодом (Yinda et al., 2018). У четырех из них (P11-300, P11-378, P14-90 и P15-218) не удалось идентифицировать присутствие гена капсида. Эти ПБВ-подобные геномы содержали только последовательность гена RdRp с митохондриальным генетическим кодом плесени. Отсутствие гена белка капсида в них напоминало геном митовирусов из семейства *Mitoviridae*, которые, как известно, инфицируют митохондрии одноклеточных плесневых грибов (рис. 3) (Hillman, Cai, 2013; Shi et al., 2016).

Геном митовирусов, как и четыре аномальных ПБВ-подобных генома, состоит из дцРНК и кодирует только RdRp. Митовирусы лишены капсида, воспроизводятся в митохондриях и для трансляции своего RdRp обычно используют генетический код митохондрий плесени. Так появилось предположение, что хозяевами ПБВ могут являться плесневые грибы (Yinda et al., 2018; Kleymann et al., 2020).

Однако, в отличие от митовирусов, у выявленных С.К. Yinda с коллегами (Yinda et al., 2018) безкапсидных ПБВ-подобных штаммов в единственном сегменте гено-

ма RdRp присутствовали характерные для ПБВ консервативные участки. В геноме пятого ПБВ-подобного штамма (P16-366), кроме характерных консервативных для ПБВ особенностей гена RdRp, была обнаружена последовательность, кодирующая белок капсида. Этот штамм клас-теризовался на филогенетическом дереве вместе с ПБВ геногруппы GII, но он использовал альтернативный генетический код и в плане организации генома был очень похож на вирусы грибов семейства *Partitiviridae* (Duquero-roy et al., 2009). Эти семейства имеют минималистичный геном, состоящий из двух сегментов дцРНК, кодирующих RdRp и белок капсида соответственно, который у этих семейств явно гомологичен (Wolf et al., 2018).

Аналогично у мангуста среди типичных ПБВ-подобных штаммов был выделен штамм M17A (Kleymann et al., 2020), ген RdRp которого сохранял все консервативные для ПБВ мотивы, но имел альтернативный митохондриальный код плесени. Последовательность капсида в геноме этого штамма отсутствовала. Предположение, что ПБВ могут быть вирусами грибов или беспозвоночных, как справедливо замечено S. Ghosh, Y.S. Malik (2021), еще более усложнило дискуссию об истинных хозяевах ПБВ.

Дискуссия о происхождении аномальных ПБВ-подобных штаммов

В ходе дискуссии об истинных хозяевах ПБВ исследователи предприняли попытки интерпретации причин появления ПБВ-подобных штаммов (Shackelton et al., 2008; Wolf et al., 2018; Yinda et al., 2018; Shahi et al., 2019; Ghosh, Malik, 2021). В частности, С.К. Yinda с соавторами (Yinda et al., 2018) предположили, что ПБВ-подобные штаммы, обнаруженные в содержимом кишечника разных эукариотических хозяев, с геномом, напоминающим геном митовирусов, могут иметь способ воспроизводства, сходный с митовирусами. При таком способе воспроизводства ген белка капсида не нужен, поскольку митовирусы не используют путь самостоятельного горизонтального переноса от клетки к клетке, а передаются вертикально от материнских клеток дочерним (при делении) или горизонтально (посредством слияния гиф). Аналогично при сборке новых ПБВ-подобных частиц могут формироваться упрощенные структуры с характерной для митовирусов адаптацией к существованию в клетке гриба и утратившие ген белка капсида. Такая трактовка появления безкапсидных РНК-вирусов согласуется с одной из тенденций в эволюции РНК-вирусов, связанной с потерей их геномом структурного модуля, замеченной Y.I. Wolf с коллегами (Wolf et al., 2018).

Тенденцию в эволюции РНК-вирусов, связанную с потерей сегмента генома с геном капсида, демонстрирует схема родословной эукариотических вирусов с РНК-геномом, представленная на рис. 4. Эта схема объясняет и происхождение капсидированных РНК-вирусов одноклеточных эукариот.

Эволюция безкапсидных вирусов низших эукариот (грибов и беспозвоночных) идет по пути сокращения генома ввиду утраты гена белка капсида их вероятного предка – левивируса, инфицирующего прокариот (вектор эволюции под цифрой 1 на рис. 4, ведущий к появлению в конце семейства *Narnaviridae*). В соответствии со схемой

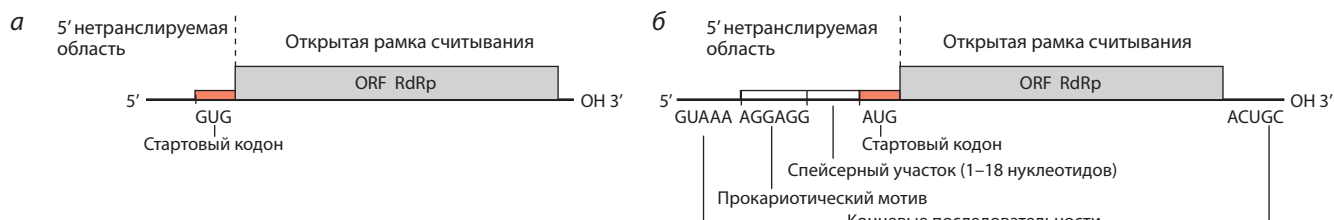


Рис. 3. Геномы митовируса (а) и пикобирнавируса (б).

В геноме митовируса с митохондриальным генетическим кодом (а) отсутствуют мотивы, характерные для вирусов со стандартным генетическим кодом. Геном пикобирнавируса со стандартным генетическим кодом (б) содержит характерные для ПБВ мотивы и прокаротический мотив.

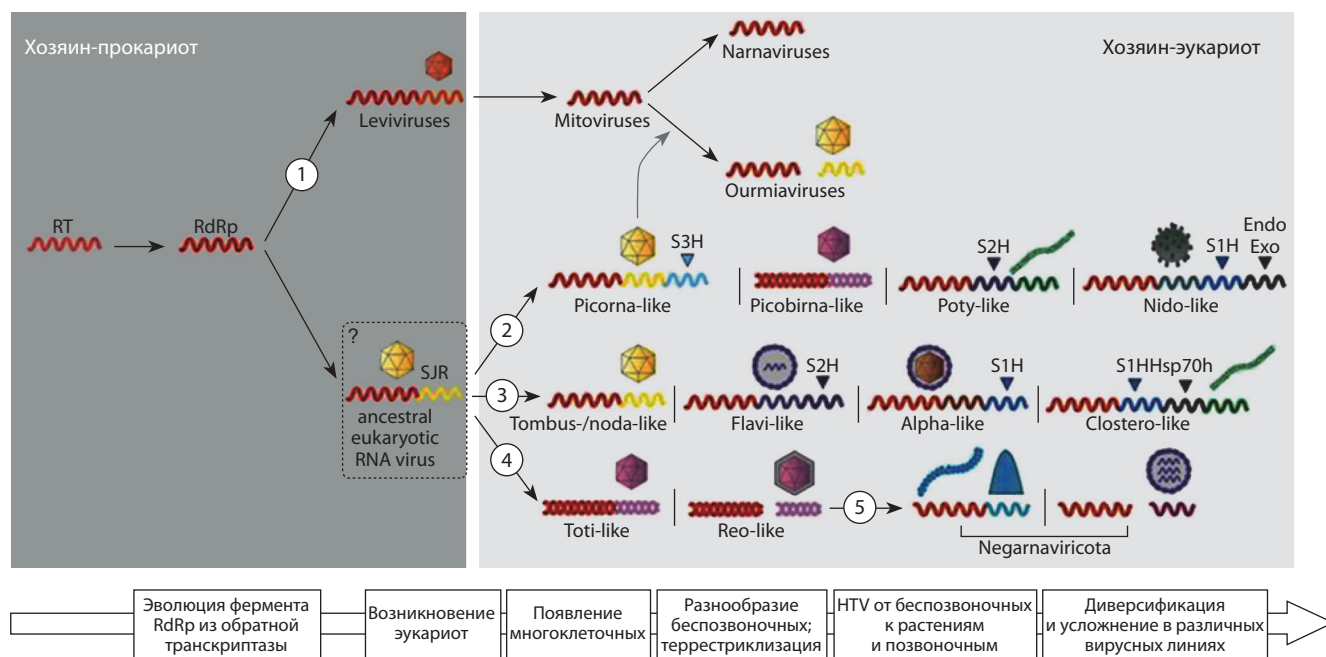


Рис. 4. Схема, демонстрирующая родословную (происхождение) эукариотических вирусов с РНК-геномом (Wolf et al., 2018).

предок митовирусов из семейства *Mitoviridae* произошел от семейства *Leviviridae*, ранее содержащего ген капсидного белка. Показательным примером сокращения генома служат гиповирусы – безкапсидные вирусы с дцРНК, структура и филогенетический анализ генома которых показали, что они произошли от потивирусов, утративших капсидный белок (Dawe, Nuss, 2013; Chauhan et al., 2021) и ген белка капсида, попав в клетки одноклеточных эукарот. Репликация митовирусов осуществляется только в митохондриях, где реплицируются их безкапсидные («голые») РНК-геномы (репликоны). С потерей структурного гена митовирусы утратили и способность к самостоятельной горизонтальной передаче (Shackelton, Holmes, 2008).

Происхождение группы безкапсидных ПБВ-подобных штаммов, выделенных (Yinda et al., 2018; Kleymann et al., 2020) у камерунских летучих мышей (P11-300, P11-378, P14-90 и P15-218) и у мангуста (штамм M17A), также можно объяснить потерей родительским штаммом сегмента генома, кодирующего капсидный белок.

В то же время безкапсидный РНК-вирус (митовирус) мог в процессе эволюции приобрести капсид (конечное направление вектора 1, ведущее к появлению семейства

Ourmiaviridae) за счет слияния своего голого РНК-репликона с репликоном белка капсида +РНК-вируса эукарот, возможно, имеющего в качестве предка вирус эукарот (вектор эволюции 2 на рис. 4). Таким эволюционным путем могли появиться инкапсидированные штаммы РНК-вирусов и, вероятно, ПБВ-подобные аналоги.

Слияние или утрату сегментов генома у РНК-вирусов исследователи объясняют другой тенденцией в их эволюции – способностью к реассортации, т. е. перераспределению генных модулей (RdRp и белка капсида) между близкородственными семействами вирусов со сходными генами. Реассортационная модификация генома замечена и у ПБВ (Conceição-Neto et al., 2016). Творческой ролью реассортации между семействами РНК-вирусов со сходными генами сторонники данного механизма генетического изменения вирусов объясняют происхождение ПБВ-подобного штамма P16-366, обнаруженного у летучих мышей (Yinda et al., 2018). Данный штамм содержал вместе с последовательностью гена RdRp (с нестандартным митохондриальным кодом) последовательность, кодирующую белок капсида. Предполагаемое генетическое сходство между семействами вирусов с бисег-

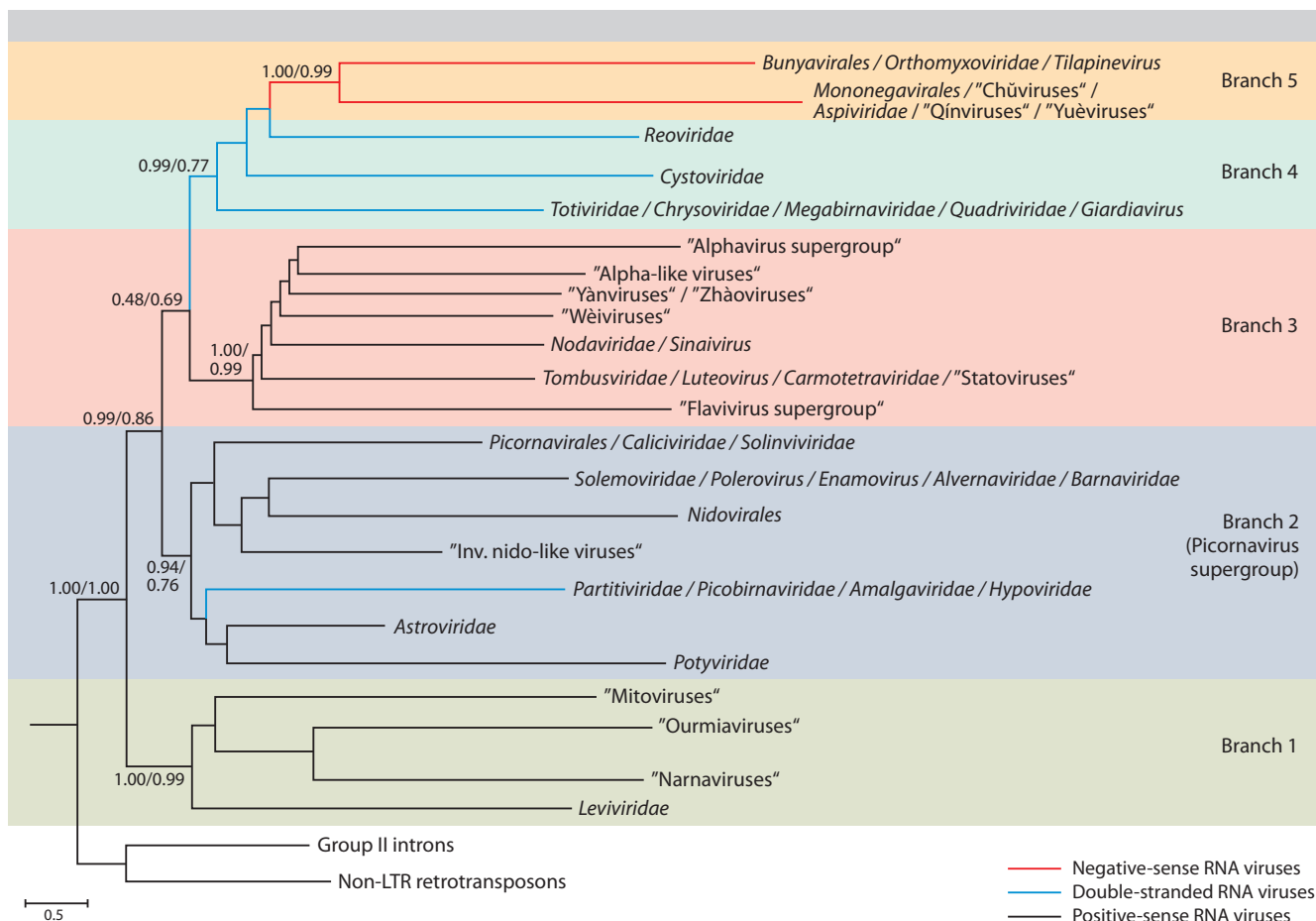


Рис. 5. Филогенетическое дерево вирусов с РНК-геномом, построенное на основе последовательностей генов РНК-зависимой РНК-полимеразы и обратной транскриптазы (Wolf et al., 2018).

Изображены пять основных ветвей, среди которых ветви 1, 2 и 4 имеют непосредственное отношение к происхождению атипичных ПБВ-подобных штаммов.

ментированным дцРНК-геномом основано на гипотезе реассортационного механизма эволюции этих вирусов (Wolf et al., 2018).

О родстве ПБВ с семействами вирусов с дцРНК-геномом

В основе филогенетической связи между семействами РНК-вирусов с сегментированным геномом лежит информация о первичной структуре гена RdRp. Этот ген универсален и, несмотря на значительно большее распространение среди вирусов эукариот, присутствует почти у всех РНК-содержащих вирусов (включая безкапсидные репликоны РНК), за исключением некоторых сателлитных вирусов (Dolja, Koonin, 2018). Универсальность гена RdRp указывает на возможность его общего происхождения у РНК-вирусов. В 2018 г. была выдвинута гипотеза (Wolf et al., 2018), предполагающая наличие филогенетических связей между семействами РНК-содержащих вирусов, и построено филогенетическое дерево (рис. 5), топология которого демонстрирует возможную связь между этими семействами.

Филогенетическое дерево, построенное на основании множества филогенетических данных, дает представле-

ние о возможном происхождении ПБВ. Это дерево подтверждает сценарий эволюции, при котором последними общими предками линий вирусов с дцРНК-геномом были простые вирусы, сегментированный геном которых содержал два гена (RdRp и белка капсида). По предположению авторов гипотезы, все вирусы с дцРНК-геномом в ветвях 2 и 4 филогенетического дерева имеют сходные капсидные белки, которые могут сочетаться с геном RdRp от разных вирусов с +РНК-геномом.

Вирусы с дцРНК-геномом – *Partitiviridae*, *Picobirnaviridae*, *Cystoviridae*, *Reoviridae* и *Totiviridae* – составляют отдельные линии в двух ветвях филогенетического дерева. Вирусы семейства *Picobirnaviridae* находятся на одной линии с семействами *Hypoviridae*, *Amalgaviridae* и *Partitiviridae*. Самые филогенетически близкие семейства, образующие один кластер, – это *Picobirnaviridae* и *Partitiviridae*. Близкое расположение этих семейств демонстрирует высокую степень родства между ними. Их объединяют сходная организация вирионов и гомологичные белки капсида (Duquerroy et al., 2009; Wolf et al., 2018). Различие между этими вирусами заключается в том, что поверхностные белки капсида ПБВ, в отличие от таковых партитивиров, обладают перфорационной активностью,

обуславливающей способность проникновения вируса в клетку. Кроме того, в связи со способностью ПБВ к горизонтальному распространению два сегмента его генома при сборке объединяются в один капсид, а у партитивиров ген RdRp и ген белка капсида используют отдельные капсиды (Vainio et al., 2018).

Ген капсидного белка ПБВ отдаленно родственен генам белков капсида других вирусов с дцРНК-геномом (*Totiviridae*, *Reoviridae* и *Cystoviridae*), составляющих три параллельные эволюционные линии в ветви 4 филогенетического дерева (Wolf et al., 2018). О значительной гомологии генов, кодирующих белок капсида вирусов семейств *Reoviridae*, *Totiviridae*, *Cystoviridae*, *Picobirnaviridae* и *Partitiviridae*, говорилось и ранее (Львов и др., 2013; El Omari et al., 2013; Luque et al., 2014).

Три эволюционные линии ветви 4 филогенетического дерева образованы семействами вирусов, инфицирующими как прокариот (*Cystoviridae*), так и эукариот (*Reoviridae*, *Totiviridae*). Расположение этих вирусных семейств на одной ветви, по мнению авторов филогенетического дерева, не исключает возможности происхождения эукариотических +РНК-вирусов от их прокариотических аналогов. Они допускают происхождение митовирусов (реплицирующихся в митохондриях клеток плесени) от общего с левивирусами предка – прокариотического РНК-вируса, паразитирующего в энтеробактериях. Доказательством этому может служить эволюционное родство между цистовирусами (вирусы бактерий) и реовирусами (Poranen, Bamford, 2012; El Omari et al., 2013).

Как предполагают сторонники творческой роли реассортации, происхождение ПБВ-подобного штамма Р16-366 могло стать результатом реассортации между еще не обнаруженным родственником ПБВ из ветви 2, перешедшим к размножению в митохондриях клеток грибов, и одним из вирусов с дцРНК-геномом ветви 4 (см. рис. 5). Причем замечено, что генетические ограничения на способность создавать реассортанты при коинфекции с вирусами семейств, образующих ветвь 4 филогенетического дерева, могут быть менее строгими для семейства вирусов прокариот *Cystoviridae*. Появление капсидированного ПБВ-подобного штамма Р16-366 произошло вследствие объединения сегмента с геном RdRp +РНК-вируса ветви 2 (возможно, голого РНК-репликона), использующего митохондриальный код, с сегментом гена капсида дцРНК-вируса ветви 4.

Еще одним направлением в эволюции вирусов с бисегментированным дцРНК-геномом является приобретение партитности – распределения сегментов генома в одну (монопартитные) или отдельные (би-мультипартитные) частицы. Данная тенденция интересна тем, что способствует пониманию природы хозяев ПБВ-подобных штаммов (прокариотической или эукариотической). Например, бипартитность замечена только у вирусов грибов (*Partitiviridae*) с дцРНК-геномом и у вирусов растений с одноцепочечным ДНК-геномом (*Begomoviruses*) (Nibert et al., 2013). У вирусов бактерий вообще и с сегментированным дцРНК-геномом в частности (*Cystoviridae*) распределения сегментов генома в отдельные частицы не наблюдается. Партитность связана со способом передачи вируса (самостоятельный или несамостоятельный).

Так, партитивные вирусы, паразитирующие в клетках грибов, не обладают способностью к самостоятельному (горизонтальному) распространению, и они бипартитны, тогда как ПБВ, распространяющиеся самостоятельно, монопартитны. Горизонтальный (самостоятельный) путь распространения позволяет им с большей вероятностью передать оба сегмента генома в новую клетку. Способность к самостоятельному (горизонтальному) распространению в новые клетки можно рассматривать в качестве одного из основных критериев, позволяющих определить истинного хозяина выявленного вируса.

Наличие молекулярного аппарата для проникновения в клетку – важный критерий, определяющий природу хозяина ПБВ

В ходе ознакомления с исследованиями, решающими вопрос о природе ПБВ и ПБВ-подобных штаммов, мы пришли к пониманию, что принадлежность этих вирусов к вирусам бактерий, высших или низших эукариот может определяться не только по характерному уровню насыщенности их генома прокариотическим мотивом, стандартным или митохондриальным генетическим кодом. Эта принадлежность в неменьшей степени должна детерминироваться наличием или отсутствием специфической (по отношению к клетке-хозяину) протеолитической активности белка капсида, обуславливающей возможность самостоятельного проникновения вируса в клетку. Способность к самостоятельной горизонтальной передаче характерна для вирусов животных и фагов, в то время как у вирусов низших эукариот (партитивных, митовирусов) она отсутствует. Белки капсида ПБВ обладают перфорационной активностью (Duquerroy et al., 2009). Это делает ПБВ способными к самостоятельному проникновению внутрь клеток и, следовательно, может характеризовать их как бактериальные вирусы.

Таким образом, мы можем заключить, что в решении вопроса об истинном хозяине ПБВ, в котором они могут размножаться, кроме консервативных мотивов, характерных для генома ПБВ, определяющим фактором является наличие механизма специфического горизонтального проникновения в клетку – белков капсида со специфической перфорационной активностью. Если эти белки специфичны к рецепторам прокариотической клетки, например клетки *Firmicutes* (Adriaenssens et al., 2018), то мы имеем дело с фагом, если специфичны к рецепторам эукариотической клетки, – с вирусом высших эукариот, а если белки капсида отсутствуют вовсе, то такой вирус можно отнести к вирусам низших эукариот (не способных к самостоятельному распространению).

Предположение о происхождении атипичных ПБВ-подобных штаммов не противоречит гипотезе фаговой природы ПБВ

Существование атипичных ПБВ-подобных штаммов не может служить опровержением предполагаемой фаговой природы ПБВ по ряду причин. Согласно гипотезе (Wolf et al., 2018), между семействами вирусов с дцРНК-геномом в структуре филогенетического дерева существуют родственные отношения, о чем свидетельствуют наличие гомологичных генов и общий предок, относящийся к

РНК-вирусам прокариот. Причем семейства РНК-вирусов эукариот и прокариот могут состоять в родстве, доказательством чему служит эволюционная связь между цисто- и реовирусами (Poranen, Bamford, 2012; El Omari et al., 2013). Это свидетельствует в пользу предположения о возможности обмена гомологичными сегментами генома между вирусами прокариот и родственными им вирусами низших эукариот, когда те и другие оказываются в клетке плесневого гриба или беспозвоночного.

Недавно стало известно, что вирусы бактерий способны не только инфицировать бактериальные клетки, но и проходить сквозь клетки эпителия эукариот с помощью механизма фагового транцитоза. Из клеток эпителия через кровь или лимфу фаги могут попасть в разные органы и ткани животных. Однако внутрь эукариотической клетки фаги проникают только с инфицированной ими бактериальной клеткой (Nguyen et al., 2017). Повсеместное выделение ПБВ из сред, где встречаются бактерии, означает, что эти вирусы могут быть не внутриклеточными вирусами эукариот, а прокариотическими вирусами микробиома кишечника (Кашников и др., 2020; Ghosh, Malik, 2021). Подтверждением предположения, что ПБВ способны инфицировать прокариотические клетки, является присутствие в их геноме консервативной прокариотической последовательности Шайна–Дальгарно (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018).

Выявление атипичных ПБВ-подобных последовательностей с нестандартным митохондриальным генетическим кодом грибов и беспозвоночных служит доказательством, что ПБВ способны к воспроизводству себе подобных и в клетках низших эукариот, претерпевая генетические изменения при смене хозяина (Yinda et al., 2018; Kleymann et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

Следовательно, можно предположить, что ПБВ способны попасть в эукариотическую клетку (будь то клетка гриба, беспозвоночного или другого хозяина), где встретятся с вирусом эукариот или прокариот со сходным геномом. Среди партнеров ПБВ по реассортации могут оказаться вирусы, подобные митовирусам, партитивирисам или цистовирусам. После перегруппировки сегментов генома ПБВ с вирусами-партнерами вполне вероятно появление ПБВ-подобных реассортантов (Yinda et al., 2018; Kleymann et al., 2020). Тогда, согласно предположениям авторов гипотезы реассортационного взаимодействия, в зависимости от присутствия или отсутствия прокариотических мотивов и мотивов, характерных для ПБВ, а также в зависимости от генетического кода, используемого геном нового вируса (стандартного или митохондриального), будет определяться не только степень его родства с ПБВ, но и его прокариотическая или эукариотическая природа.

Гипотеза, объясняющая образование атипичных штаммов ПБВ посредством обмена гомологичными сегментами генома между родственными вирусными семействами не исключает возможности их появления с помощью сателлитных отношений между ПБВ и вирусами-помощниками из 2-й или 4-й ветвей филогенетического дерева. Вирусы из семейств *Partitiviridae*, *Totiviridae*, *Reoviridae* известны как вирусы-помощники, в которых для своей репродукции нуждаются некоторые сателлитные дцРНК (Львов и др., 2013). Допуская, что ПБВ – сателлит, ис-

пользующий для размножения в клетках гриба фермент RdRp вируса-помощника, сходного с митовирусом (из ветви 2), можно объяснить появление безкапсидных ПБВ-подобных штаммов с митохондриальным генетическим кодом P11-300, P11-378, P14-90 и P15-218, выделенных (Yinda et al., 2018), или M17A (Kleymann et al., 2020).

Использованием в качестве помощника вируса из ветви 2 или 4 (подобного *Partitiviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae* или *Cystoviridae*) можно объяснить появление капсидированного ПБВ-подобного штамма P16-366. Иными словами, и в данном случае способность потомства, полученного при взаимодействии вируса-сателлита с вирусом-помощником, к воспроизводству в бактериальной клетке или в митохондриях плесени будет зависеть от природы вируса-помощника. И это не противоречит предполагаемой прокариотической природе ПБВ, а лишь означает возможность ее изменения в реассортационном процессе.

Аргументы в поддержку гипотезы о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот

Пикобирнавирусы находят везде, где встречаются бактерии: в образцах окружающей среды, у низших эукариот (грибов и беспозвоночных), в содержимом кишечника высших эукариот (включая рептилий). Это означает, что ПБВ могут быть не внутриклеточными вирусами эукариот, а прокариотическими вирусами микробиома кишечника (Ghosh, Malik, 2021).

Подобно прокариотическим цистовирусам, в геномах ПБВ присутствуют и сохраняются в насыщенном состоянии (в обоих сегментах генома в каждой рамке считывания) функциональные сайты связывания с рибосомами бактериального типа (последовательности Шайна–Дальгарно), в то время как у вирусов эукариот геном не насыщен ими (Boros et al., 2018; Krishnamurthy, Wang, 2018).

Выявление у разных видов животных родственных штаммов ПБВ может означать, что хозяевами ПБВ является конкретный тип бактерий, возможно *Firmicutes*, встречающийся в кишечнике у разных позвоночных и беспозвоночных. Уровень сохранения прокариотических участков в геноме этих бактерий (более 80 % генов) соответствует таковому у ПБВ (Krishnamurthy, Wang, 2018).

Обнаружение ПБВ в кишечнике, в органах дыхания животных (у крупного рогатого скота, у людей, обезьян, свиней), в крови и респираторных образцах (Lee, Bent, 2014; Blanco-Picazo et al., 2020) не опровергает предположения, что клетки бактерий могут являться их хозяевами. Фаги не могут напрямую инфицировать клетки разных органов высших эукариот, но в эти органы они могут попасть путем неспецифической транслокации через эпителий кишечника с кровотоком (Nguyen et al., 2017) или с помощью бактерий, в которых они размножаются (Dabrowska et al., 2005). Так фаги проникают в кровь, лимфу, органы и даже мозг.

Обладание капсидным белком с перфорационной активностью (способностью к транслокации через клеточную мембрану), как и у вирусов, способных инфицировать клетки животных (Duquerroy et al., 2009), не противоречит тому, что ПБВ могут быть прокариотическими РНК-вирусами. Известно, что и представители семейства бактериальных РНК-вирусов имеют молекулярный аппарат для

проникновения в клетки бактерий с помощью трансцитоза (Reed et al., 2013; Nguyen et al., 2017).

Приобретение инфицированными животными иммунитета к ПБВ также не означает, что ПБВ могут считаться эукариотическими вирусами, поскольку установлено, что иммунные ответы хозяина могут возникать и против бактериальных вирусов (Dabrowska et al., 2005; Górski et al., 2006). Возможно, ПБВ вызывают иммунный ответ на заражение не клеток хозяина, а бактериальных клеток, составляющих его микробиом, что не исключает возможности того, что ПБВ – это вирусы прокариот.

Подобно фагам, которые бывают вирулентные и умеренные, в зараженном организме ПБВ могут находиться в активном состоянии (экскрецироваться) и неактивном (временно не экскрецироваться). При этом инфицированные животные будут бессимптомными носителями (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Kumar et al., 2020; Ghosh, Malik, 2021).

Выявление ПБВ-подобных штаммов с геном RdRp, использующим альтернативный митохондриальный генетический код низших эукариот (плесени, беспозвоночных) для трансляции, также не является опровержением предположения о принадлежности ПБВ к вирусам прокариот. Согласно гипотезе (Wolf et al., 2018), они представляют собой результат реассортации между ПБВ и семействами РНК-вирусов со сходным геномом. Появление атипичных ПБВ-подобных штаммов свидетельствует лишь о возможности эволюционного перехода прокариотической природы вируса в эукариотическую и обратно в результате пересортировки геномных сегментов и объясняется изменением степени насыщения генома нового вируса прокариотическими участками, от чего может измениться и его природа. Не исключена возможность сателлитных отношений между ПБВ и РНК-вирусами низших эукариот, таких как *Partitiviridae*, *Totiviridae* и *Reoviridae*, которые известны как вирусы-помощники. Известны случаи сателлитных отношений между вирусами прокариот и низших эукариот, заражающими одного одноклеточного хозяина, позволяющие воспроизводить фагам новое потомство в эукариотической клетке (Gogarten, Townsend, 2005; Claverie, Abergel, 2009; Thannesberger et al., 2017).

Осуществлена экспрессия и функционирование *in vivo* сегмента 1 ПБВ в *Escherichia coli* (Boros et al., 2018), что подтверждает существование бактериальной культуры для размножения ПБВ.

Заключение

Приведенные аргументы убедительно показывают, что ПБВ действительно могут являться вирусами прокариот, поскольку их находят везде, где встречаются бактерии: в образцах окружающей среды, в содержимом кишечника позвоночных, в клетках грибов и беспозвоночных.

Подобно прокариотическим цистовирусам, в геноме ПБВ присутствуют и сохраняются в насыщенном состоянии функциональные сайты связывания с рибосомами бактериального типа, тогда как у вирусов эукариот геном этими мотивами не насыщен. Высокий уровень сохранения прокариотических участков в геноме ПБВ позволяет предположить, что они относятся к новому семейству РНК-вирусов, инфицирующих определенный тип бакте-

рий, с высоким содержанием SD-последовательностей в геноме. Такими бактериями-хозяевами ПБВ могут быть *Firmicutes*, встречающиеся в кишечнике у позвоночных и беспозвоночных, которые обладают аналогичным уровнем собственных бактерий прокариотических мотивов. Высокую частоту присутствия SD-последовательностей в геноме ПБВ можно считать одним из основных критериев, позволяющих идентифицировать новые семейства вирусов на принадлежность к прокариотическому или эукариотическому хозяину.

Но, чтобы вирус можно было окончательно отнести к фагам, в его геноме должен также присутствовать структурный ген, кодирующий белок со специфическими протеолитическими свойствами, определяющими способность вируса к самостоятельному проникновению в бактериальную клетку. Белок с протеолитическими свойствами присутствует в капсиде ПБВ, что указывает на способность этого вируса к горизонтальному (самостоятельному) распространению из клетки в клетку, к трансмиссии от одного хозяина к другому. В то же время обнаружение ПБВ в кишечнике у самых разных хозяев позволяет предполагать, что их горизонтальный перенос осуществляют бактерии и, следовательно, сами эти вирусы являются фагами. Фаговой природой ПБВ, обуславливающей их способность к неспецифической транслокации через стенки эпителиальных клеток кишечника, можно объяснить их выявление в разных тканях организма.

Дополнительным аргументом в предположении фаговой природы ПБВ служит также удачный эксперимент по воспроизводству *in vivo* сегмента 1 генома ПБВ в *Escherichia coli*, подтверждающий возможность существования бактериальной культуры для размножения данного вируса. Подбор культуры для размножения вируса необходим для окончательного определения его природы. До настоящего времени не доказана принадлежность ПБВ к вирусам высших эукариот, поскольку не удалось их выделить из культур эукариотических клеток. Чтобы окончательно установить, являются ли ПБВ вирусами прокариот, необходимо направить усилия на подбор хозяина для их размножения среди прокариотических клеток, полученных из микробиома кишечника млекопитающих, и подобрать условия для культивирования этих клеток.

И наконец, наличие вероятных родственников среди семейств РНК-вирусов с аналогичными генами, с которыми ПБВ могут обмениваться сегментами генома, репродуцируя атипичные генетические варианты, не противоречит правоте гипотезы о фаговой природе ПБВ, а свидетельствует об их потенциальной способности приспосабливаться к новым условиям существования, позволяющей им инфицировать эукариотические или прокариотические клетки-хозяева.

Список литературы / References

- Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Пикобирнавирусы: распространенность, генетическое разнообразие, методы детекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(6):661-672. DOI 10.18699/VJ20.660.
[Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Novikova N.A. Picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, detection methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):661-672. DOI 10.18699/VJ20.660.]

- Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю. Сателлиты. В: Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М., 2013;350-352.
[Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Shchelkanov M.Yu. Satellites. In: Guide to Virology. Viruses and viral infections of humans and animals. Moscow, 2013;350-352. (in Russian)]
- Adriaenssens E.M., Farkas K., Harrison C., Jones D.L., Allison H.E., McCarthy A.J. Viomic analysis of wastewater input to a river catchment reveals a diverse assemblage of RNA viruses. *mSystems*. 2018; 3(3):1-18. DOI 10.1128/mSystems.00025-18.
- Bell N., Khamrin P., Kumthip K., Rojjanadumrongkul K., Nantachit N., Maneekarn N. Molecular detection and characterization of picobirnavirus in environmental water in Thailand. *Clin. Lab.* 2020;66: 85-88. DOI 10.7754/CLIN.LAB.2019.191013.
- Blanco-Picazo P., Fernández-Orth D., Brown-Jaque M., Miró E., Espinal P., Rodríguez-Rubio L., Muniesa M., Navarro F. Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Sci. Rep.* 2020;10:6737. DOI 10.1038/s41598-020-63432-7.
- Boros Á., Polgár B., Pankovics P., Fenyvesi H., Engelmann P., Phan T.G., Delwart E., Reuter G. Multiple divergent picobirnaviruses with functional prokaryotic Shine-Dalgarno ribosome binding sites present in cloacal sample of a diarrheic chicken. *Virology*. 2018;525:62-72. DOI 10.1016/j.virol.2018.09.008.
- Chauhan R., Awasthi S., Narayan R.P. Chapter 11 – Evolution and diversity of plant RNA viruses. In: Rajarshi Kumar Gaur, S.M. Paul Khurana, Pradeep Sharma, Thomas Hohn (Eds.) Plant Virus-Host Interaction: Molecular Approaches and Viral Evolution. Second Edn. Acad. Press, 2021;303-318. DOI 10.1016/B978-0-12-821629-3.00020-8.
- Claverie J.M., Abergel C. Mimivirus and its viroplasm. *Ann. Rev. Genet.* 2009;43:49-66. DOI 10.1146/annurev-genet-102108-134255.
- Conceição-Neto N., Mesquita J.R., Zeller M., Yinda C.K., Álvares F., Roque S., Petrucci-Fonseca F., Godinho R., Heylen E., Van Ranst M., Matthijssens J. Reassortment among picobirnaviruses found in wolves. *Arch. Virol.* 2016;161:2859-2862. DOI 10.1007/s00705-016-2987-4.
- Dabrowska K., Switala-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 2005;98:7-13. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02422.x.
- Dawe A.L., Nuss D.L. Hypovirus molecular biology: from Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus transmission. *Adv. Virus Res.* 2013;86:109-147.
- Delmas B., Attoui H., Ghosh S., Malik Y.S., Mundt E., Vakharia V.N. ICTV virus taxonomy profile: *Picobirnaviridae*. *J. Gen. Virol.* 2019; 100:133-134. DOI 10.1099/jgv.0.001186.
- Dolja V.V., Koonin E.V. Metagenomics reshapes the concepts of RNA virus evolution by revealing extensive horizontal virus transfer. *Virus Res.* 2018;244:36-52. DOI 10.1016/j.virusres.2017.10.020.
- Duquerroy S., Da Costa B., Henry C., Vigouroux A., Libersou S., Lepault J., Navaza J., Delmas B., Rey F.A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *EMBO J.* 2009;28:1655-1665. DOI 10.1038/emboj.2009.109.
- Duraissamy R., Akiana J., Davoust B., Mediannikov O., Michelle C., Robert C., Parra H.-J., Raoult D., Biagini P., Desnues C. Detection of novel RNA viruses from free-living gorillas, Republic of the Congo: genetic diversity of picobirnaviruses. *Virus Genes*. 2018;54: 256-271. DOI 10.1007/s11262-018-1543-6.
- El Omari K., Sutton G., Ravanti J.J., Zhang H., Walter T.S., Grimes J.M., Bamford D.H., Stuart D.I., Mancini E.J. Plate tectonics of virus shell assembly and reorganization in phage $\phi 8$, a distant relative of mammalian reoviruses. *Structure*. 2013;21:1384-1395. DOI 10.1016/j.str.2013.06.017.
- Gallagher C.A., Navarro R., Cruz K., Aung M.S., Ng A., Bajak E., Beierschmitt A., Lawrence M., Dore K.M., Ketzis J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Detection of picobirnaviruses in vervet monkeys (*Chlorocebus sabaeus*): molecular characterization of complete genomic segment-2. *Virus Res.* 2017;230:13-18. DOI 10.1016/j.virusres.2016.12.021.
- Ganesh B., Masachessi G., Mladenova Z. Animal picobirnavirus. *Virus Disease*. 2014;25:223-238. DOI 10.1007/s13337-014-0207-y.
- Ghosh S., Malik Y.S. The true host/s of picobirnaviruses. *Front. Vet. Sci.* 2021;7:1-9. DOI 10.3389/fvets.2020.615293.
- Ghosh S., Shiokawa K., Aung M.S., Malik Y.S., Kobayashi N. High detection rates of picobirnaviruses in free roaming rats (*Rattus* spp.): molecular characterization of complete gene segment-2. *Infect. Genet. Evol.* 2018;65:131-135. DOI 10.1016/j.meegid.2018.07.024.
- Gogarten J.P., Townsend J.P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3(9):679-687. DOI 10.1038/nrmicro1204.
- Górski A., Kniotek M., Perkowska-Ptasńska A., Mróz A., Przerwa A., Gorczyca W., Dabrowska K., Weber-Dabrowska B., Nowaczyk M. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant. Proc.* 2006;38:331-333. DOI 10.1016/j.transproceed.2005.12.073.
- Guajardo-Leiva S., Chnaiderman J., Gaggero A., Díez B. Metagenomic insights into the sewage RNA virosphere of a large city. *Viruses*. 2020;12:1050. DOI 10.3390/v12091050.
- Hillman B.I., Cai G. Chapter Six – The family *Narnaviridae*: simplest of RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 2013;86:149-176. DOI 10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4.
- Joycelyn S.J., Ng A., Kleymann A., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. High detection rates and genetic diversity of picobirnaviruses (PBVs) in pigs on St. Kitts Island: identification of a porcine PBV strain closely related to simian and human PBVs. *Infect. Genet. Evol.* 2020;84:104383. DOI 10.1016/j.meegid.2020.104383.
- Kleymann A., Becker A.A.M.J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Detection and molecular characterization of picobirnaviruses (PBVs) in the mongoose: identification of a novel PBV using an alternative genetic code. *Viruses*. 2020;12(1):99. DOI 10.3390/v12010099.
- Knox M.A., Gedy K.R., Hayman D.T.S. The challenges of analysing highly diverse picobirnavirus sequence data. *Viruses*. 2018;10:685. DOI 10.3390/v10120685.
- Krishnamurthy S.R., Wang D. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. *Virology*. 2018;516:108-114. DOI 10.1016/j.virol.2018.01.006.
- Kumar N., Mascarenhas J.D.A.P., Ghosh S., Masachessi G., da Silva Bandeira R., Nates S.V., Dhama K., Singh R.K., Malik Y.S. Picobirnavirus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dhama K. (Eds.) Animal-Origin Viral Zoonoses. Singapore: Springer, 2020;291-312.
- Kunz A.F., Possatti F., de Freitas J.A., Alfieri A.A., Takiuchi E. High detection rate and genetic diversity of picobirnavirus in a sheep flock in Brazil. *Virus Res.* 2018;255:10-13. DOI 10.1016/j.virusres.2018.06.016.
- Lee C.K., Bent S.J. Uncovering the hidden villain within the human respiratory microbiome. *Diagnosis*. 2014;1:203-212. DOI 10.1515/dx-2014-0039.
- Li L., Giannitti F., Low J., Keyes C., Ullmann L.S., Deng X., Aleman M., Pesavento P.A., Pusterla N., Delwart E. Exploring the virome of diseased horses. *J. Gen. Virol.* 2015;96:2721-2733. DOI 10.1099/vir.0.000199.
- Luo X.L., Lu S., Jin D., Yang J., Wu S.S., Xu J. *Marmota himalayana* in the Qinghai-Tibetan plateau as a special host for bi-segmented and unsegmented picobirnaviruses. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1):20. DOI 10.1038/s41426-018-0020-6.
- Luque D., Gómez-Blanco J., Garriga D., Brilot A.F., González J.M., Havens W.M., Carrascosa J.L., Trus B.L., Verdager N., Ghabrial S.A., Castón J.R. Cryo-EM near-atomic structure of a dsRNA fungal virus shows ancient structural motifs preserved in the dsRNA viral lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:7641-7646. DOI 10.1073/pnas.1404330111.
- Malik Y.S., Kumar N., Sharma K., Dhama K., Shabbir M.Z., Ganesh B., Kobayashi N., Banyai K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. *Biomed. Res. Int.* 2014;2014:780752. DOI 10.1155/2014/780752.

- Mindich L. Bacteriophage Ø6: a unique virus having a lipid-containing membrane and a genome composed of three dsRNA segments. *Adv. Virus Res.* 1988;35:137-173. DOI 10.1016/S0065-3527(08)60710-1.
- Navarro R., Yibin C., Nair R., Peda A., Aung M.S., Ketzis J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Molecular characterization of complete genomic segment-2 of picobirnavirus strains detected in a cat and a dog. *Infect. Genet. Evol.* 2017;54:200-204. DOI 10.1016/j.meegid.2017.07.006.
- Nguyen S., Baker K., Padman B.S., Patwa R., Dunstan R.A., Weston T.A., Schlosser K., Bailey B., Lithgow T., Lazarou M., Luque A., Rohwer F., Blumberg R.S., Barr J.J. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *mBio.* 2017;8:e01874-17. DOI 10.1128/mBio.01874-17.
- Nibert M.L., Tang J., Xie J., Collier A.M., Ghabrial S.A., Baker T.S., Tao Y.J. Chapter Three – 3D structures of fungal partitiviruses. *Adv. Virus Res.* 2013;86:59-85. DOI 10.1016/B978-0-12-394315-6.00003-9.
- Omotajo D., Tate T., Cho H., Choudhary M. Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes. *BMC Genomics.* 2015;16(1):604. DOI 10.1186/s12864-015-1808-6.
- Poranen M.M., Bamford D.H. Assembly of large icosahedral double-stranded RNA viruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;726:379-402. DOI 10.1007/978-1-4614-0980-9_17.
- Ramesh A., Bailey E.S., Ahyon V., Langelier C., Phelps M., Neff N., Sit R., Tato C., DeRisi J.L., Greer A.G., Gray G.C. Metagenomic characterization of swine slurry in a North American swine farm operation. *Sci. Rep.* 2021;11:16994. DOI 10.1038/s41598-021-95804-y.
- Reed C.A., Langlais C., Wang I.-N., Young R. A₂ expression and assembly regulates lysis in Qβ infections. *Microbiology.* 2013;159: 507-514. DOI 10.1099/mic.0.064790-0.
- Rosen B.I., Fang Z.-Y., Glass R.I., Monroe S.S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology.* 2000;277(2):316-329. DOI 10.1006/viro.2000.0594.
- Sekelja M., Berget I., Naes T., Rudi K. Unveiling an abundant core microbiota in the human adult colon by a phylogroup-independent searching approach. *ISME J.* 2011;5(3):519-531. DOI 10.1038/ismej.2010.129.
- Shackleton L.A., Holmes E.C. The role of alternative genetic codes in viral evolution and emergence. *J. Theor. Biol.* 2008;254:128-134. DOI 10.1016/j.jtbi.2008.05.024.
- Shahi S., Eusebio-Cope A., Kondo H., Hillman B.I., Suzuki N. Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. *J. Virol.* 2019;93:e01503-18. DOI 10.1128/JVI.01503.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., Qin X.C., Li J., Cao J.P., Eden J.S., Buchmann J., Wang W., Xu J., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature.* 2016;540:539-543. DOI 10.1038/nature20167.
- Smits S.L., Schapendonk C.M., van Beek J., Vennema H., Schürch A.C., Schipper D., Bodewes R., Haagmans B.L., Osterhaus A.D., Koopmans M.P. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(7):1218-1222. DOI 10.3201/eid2007.140190.
- Thannesberger J., Hellinger H.J., Klymiuk I., Kastner M.T., Rieder F.J.J., Schneider M., Fister S., Lion T., Kosulin K., Laengle J., Bergmann M., Rattei T., Steininger C. Viruses comprise an extensive pool of mobile genetic elements in eukaryote cell cultures and human clinical samples. *FASEB J.* 2017;31:1987-2000. DOI 10.1096/fj.201601168R.
- Vainio E.J., Chiba S., Ghabrial S.A., Maiss E., Roossinck M., Sabanadzovic S., Suzuki N., Xie J., Nibert M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Partitiviridae. *J. Gen. Virol.* 2018;99(1):17-18. DOI 10.1099/jgv.0.000985.
- Wolf Y.I., Kazlauskas D., Iranzo J., Lucía-Sanz A., Kuhn J.H., Krupovic M., Dolja V.V., Koonin E.V. Origins and evolution of the global RNA virome. *mBio.* 2018;9:e02329-18. DOI 10.1128/mBio.02329-18.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Teng J.L.L., Tsang A.K.L., Joseph M., Wong E.Y.M., Tang Y., Sivakumar S., Bai R., Wernery R., Wernery U., Yuen K.-Y. Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. *Virology.* 2014;471-473:117-125. DOI 10.1016/j.virol.2014.09.020.
- Woo P.C.Y., Teng J.L.L., Bai R., Tang Y., Wong A.Y.P., Li K.S.M., Lam C.S.F., Fan R.Y.Y., Lau S.K.P., Yuen K.-Y. Novel picobirnaviruses in respiratory and alimentary tracts of cattle and monkeys with large intra- and inter-host diversity. *Viruses.* 2019;11:574. DOI 10.3390/v11060574.
- Yinda C.K., Ghogomu S.M., Conceição-Neto N., Beller L., Deboutte W., Vanhulle E., Maes P., Van Ranst M., Matthijnssens J. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018;4:vey008. DOI 10.1093/ve/vey008.
- Yinda C.K., Vanhulle E., Conceição-Neto N., Beller L., Deboutte W., Shi C., Ghogomu S.M., Maes P., Ranst M.V., Matthijnssens J. Gut virome analysis of Cameroonians reveals high diversity of enteric viruses, including potential interspecies transmitted viruses. *mSphere.* 2019;4(1):e00585-18. DOI 10.1128/mSphere.00585-18.

ORCID ID

A.Yu. Kashnikov orcid.org/0000-0003-1033-7347
N.V. Epifanova orcid.org/0000-0001-7679-8029
N.A. Novikova orcid.org/0000-0002-3710-6648

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.05.2022. После доработки 21.07.2022. Принята к публикации 22.07.2022.

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

Обнаружение генных кластеров биодеструкции алканов и ароматических соединений в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D

Ю.А. Маркова¹, И.С. Петрушин^{1, 2}✉, Л.А. Беловежец³

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

³ Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ ivan.kiel@gmail.com

Аннотация. Многие представители рода *Rhodococcus* известны как активные биодеструкторы компонентов нефти (в том числе алканов) и ароматических соединений. Пристальное внимание, которое стали уделять родококкам в последнее время, является следствием их высокого кatabолического потенциала. Ранее нами выделен штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D из ризосферы пырея, произраставшего на нефтезагрязненной почве. По результатам филогенетического анализа этот штамм может быть отнесен к виду *Rhodococcus qingshengii*. На сегодняшний день расшифрованы пути и идентифицированы гены деструкции многих загрязнителей. Для оценки способности рассматриваемого штамма к деградации нефти и нефтепродуктов мы исследовали генные кластеры, ассоциированные с такой способностью. Ферменты деструкции алканов представлены двумя кластерами и пятью отдельно расположенными генами *alkB*. Деструкция ароматических соединений состоит из двух этапов: периферического и центрального. Геном *R. qingshengii* VKM Ac-2784D содержит четыре из восьми известных центральных путей деструкции ароматических соединений. Структура генных кластеров сходна с описанными в литературе штаммами *R. jostii* RHA1 и *R. ruber* Chol-4. Периферические пути представлены кластерами генов, кодирующих белки деструкции бензойной кислоты, ген бифенил 2,3-диоксигеназы и два гена бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназы, участвующих в кatabолизме бифенила. Присутствие генов бифенил 2,3-диоксигеназы, кластера генов бензоатного и 2-гидроксипентадиеноатного путей указывает на способность исследуемого штамма деструктировать полихлорированные бифенилы. Усилить активность биодеструкции загрязнителей помогают сурфактанты, улучшающие доступность разлагаемых веществ. Для некоторых видов *Rhodococcus* описаны биосурфактанты на основе трегалозы. В геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D присутствуют гены, кодирующие белки биосинтеза сурфактантов – *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*. Данные биоинформационного анализа согласуются с результатами ранее проведенных биохимических исследований. Знание метаболического потенциала отдельного организма, полученное в результате анализа генома, позволит создавать адаптированные к заданным условиям смеси бактериальных штаммов, объединяющие микроорганизмы с разным спектром метаболических путей деструкции.

Ключевые слова: биодеструкция; *Rhodococcus*; нефтедеструкция; геномика.

Для цитирования: Маркова Ю.А., Петрушин И.С., Беловежец Л.А. Обнаружение генных кластеров биодеструкции алканов и ароматических соединений в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(3):276-282. DOI 10.18699/VJGB-23-33

Detection of gene clusters for biodegradation of alkanes and aromatic compounds in the *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D genome

Yu.A. Markova¹, I.S. Petrushin^{1, 2}✉, L.A. Belovezhets³

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³ A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ ivan.kiel@gmail.com

Abstract. Bacterial species of the genus *Rhodococcus* are known to be efficient degraders of hydrocarbons in contaminated soil. They are also employed for bioremediation of polluted environments. These bacteria are widely met in soil, water and living organisms. Previously, we have isolated the *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D from the rhizosphere of couch grass growing on oil-contaminated soil. This strain can effectively degrade oil and some model compounds (naphthalene, anthracene and phenanthrene). The results of phylogenetic analysis show that this strain belongs to the species *R. qingshengii*. To understand the catabolic properties of this strain, we have studied its gene

clusters possessing such properties. The alkane destruction genes are represented by two clusters and five separate *alkB* genes. The destruction of aromatic compounds involves two stages, namely central and peripheral. The *R. qingshengii* VKM Ac-2784D genome contains four out of eight known central metabolic pathways for the destruction of aromatic compounds. The structure of the gene clusters is similar to that of the known strains *R. jostii* RHA1 and *R. ruber* Chol-4. The peripheral pathways include the genes encoding proteins for benzoic acid destruction. The presence of biphenyl 2,3-dioxygenases as well as gene clusters of benzoate and 2-hydroxypentadienoate pathways suggests that *R. qingshengii* VKM Ac-2784D could degrade polychlorinated biphenyls. The biodegradation ability can be enhanced by biosurfactants, which are known to be synthesized by *Rhodococcus*. The *R. qingshengii* VKM Ac-2784D genome contains the *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ* genes. The bioinformatics data are supported by the previous biochemical experiments that allow a mixture of species with a wide variation of metabolic pathways to be obtained.

Key words: biodegradation; *Rhodococcus*; oil destruction; genomics.

For citation: Markova Yu.A., Petrushin I.S., Belovezhets L.A. Detection of gene clusters for biodegradation of alkanes and aromatic compounds in the *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D genome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):276-282. DOI 10.18699/VJGB-23-33

Введение

Rhodococcus – род грамположительных бактерий класса *Actinobacteria*, повсеместно распространенных в окружающей среде. Представители этого рода выделены из почвы, пресноводных и морских водоемов, а также из живых организмов. Некоторые виды являются патогенами, в том числе *R. hoagii* (ранее *R. equi*), вызывающий зоонозные инфекции, и фитопатоген *R. fascians* (Garrido-Sanz et al., 2020).

Пристальное внимание, которое уделяют родококкам в последнее время, стало следствием их высокого каталитического потенциала. Представители рода способны к биодеструкции стойких органических загрязнителей: полиароматических углеводородов, диоксинов и диоксиноподобных соединений и др., что обуславливает их применение в составе биопрепаратов для ремедиации почв (Martínková et al., 2009).

Использование родококков в составе биопрепаратов требует понимания того, какие поллютанты способен разрушать данный микроорганизм. Наиболее полный ответ на этот вопрос может дать совместное применение биоинформационных и биохимических методов. На сегодняшний день расшифрованы пути и идентифицированы гены деструкции многих загрязнителей.

Для родококков характерно множество генных кластеров, кодирующих ферменты, разлагающие углеводороды нефти (Zampolli et al., 2019). В процессе деградации алканов участвуют гены алкан-монооксигеназа *alkB*, растворимые монооксигеназы (soluble di-iron монооксигеназа, SDIMO) и цитохром CYP153, входящий в группу цитохромов P450. Ферменты *AlkB* и CYP153 обычно участвуют в окислении жидких алканов, SDIMO действует на короткоцепочечные алканы, включая газообразные (<C8) (Coleman et al., 2011).

Деструкция ароматических соединений состоит из двух этапов: периферического и центрального. Периферические пути разнообразны (описано больше двух десятков). Благодаря им родококки способны окислять полиароматические углеводороды (ПАУ), бифенилы, стероиды или фталаты до общих интермедиатов, которые окисляются центральными путями деструкции. У родококков описано восемь центральных путей деструкции: β-кетoadипатный, фенилацетатный, 2-гидроксипентадиеноатный, гентизатный, гомогентизатный, гидроксифенильный, гомопротокатеховый пути и еще один с неизвестным суб-

стратом (Guevara et al., 2019). Гены, которые кодируют белки, участвующие в периферических путях деструкции, локализованы, как правило, на плазмидах, а гены, участвующие в центральных путях, располагаются в хромосоме.

Вспомогательную роль при деградации гидрофобных соединений выполняют биосурфактанты. Это поверхностно-активные вещества, улучшающие биодоступность разлагаемых веществ. Родококки синтезируют биосурфактанты на основе трегалозы и миколовых кислот (трегалолипиды) (Kuyukina, Ivshina, 2010).

Цель работы состояла в поиске генов, кодирующих вышеуказанные метаболические пути в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D, для выяснения его способности к деградации нефти и нефтепродуктов.

Материалы и методы

Штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D выделен нами из ризосферы пырея (*Elytrigia repens*), произрастающего на нефтезагрязненной территории в районе пос. Тыреть Иркутской области (Belovezhets et al., 2017). Установлено, что он может окислять как алканы, так и полициклические ароматические углеводороды (Belovezhets et al., 2017).

В целях изучения геномных признаков и потенциала к биодegradации, полный геном был секвенирован и опубликован в NCBI GenBank с идентификатором доступа CP064920 (Petrushin et al., 2021). Аннотированный геном *R. qingshengii* VKM Ac-2784D содержит 5775 генов, в том числе 5716 белок кодирующих-последовательностей, 3 рРНК, 53 тРНК и 3 некодирующих РНК.

Для определения видовой принадлежности последовательности субъединицы 16S рРНК была собрана из исходных данных секвенирования с помощью программы MATAM (Pericard et al., 2018). Идентификаторы последовательностей 16S рРНК видов *Rhodococcus* взяты из литературных данных по систематике этого рода (Gürtler, Seviour, 2010; Sangal et al., 2019). Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия с моделью Tamura–Nei и с параметрами по умолчанию в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Для родственных видов с выраженной активностью нефтедеструкции построены матрица средненуклеотидных расстояний и филогенетическое дерево на основе полногеномных данных с помощью программы *ryani* v. 0.2.11, режим ANIm

(<https://github.com/widdowquinn/pyani>) с параметрами по умолчанию. При расчете этих расстояний использовали алгоритм MUMmer (Deloger et al., 2009) и полные геномы исследуемых штаммов, разделяемые алгоритмом на фрагменты, как описано в оригинальной работе (Richter, Rosselló-Móra, 2009).

Поиск исследуемых генов метаболизма проводили с помощью BLAST-поиска по известным последовательностям генов деградации алканов, бифенилов и др. Подготовку иллюстраций и работу с аннотированным геномом *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D осуществляли в программе UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Анализ генов метаболических путей выполнен в онлайн-сервисе RAST SEED (Overbeek et al., 2014).

Результаты

Филогенетическое положение исследуемого штамма

Для определения видовой принадлежности штамма *R. qingshengii* VKM Ac-2784D мы использовали традиционный способ построения филогенетического дерева по последовательностям фрагмента 16S рРНК. Вместе с названиями видов на рис. 1 приведены идентификаторы последовательностей в NCBI GenBank. Для лучшего восприятия дерева (для всех описанных видов оно получается очень громоздким) внимание уделялось таксонам, наиболее близким к исследуемому штамму. Два наиболее близ-

ких вида к *R. qingshengii* VKM Ac-2784D – это *R. qingshengii* и *R. erythropolis*, оба хорошо известны в качестве нефтедеструкторов (Táncsics et al., 2015).

Поиск родственных штаммов-нефтедеструкторов

Хотя описано более 50 видов *Rhodococcus*, для нашего исследования наибольший интерес представляли организмы, являющиеся нефтедеструкторами, для которых опубликован полный геном. В процессе работы с источниками для последующего анализа нами были отобраны 30 геномов *Rhodococcus*. На основе средненуклеотидного расстояния (average nucleotide identity) была построена тепловая карта и дерево для этих геномов (рис. 2). Такой способ учитывает всю геномную информацию, а не только отличия во фрагменте рРНК. Несмотря на то что для части анализируемых штаммов вид не определен, *Rhodococcus* sp. BH4, как и исследуемый *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, может быть отнесен к виду *R. qingshengii*. Заметно также, что группа *R. erythropolis* и *R. rhodochrous* ATCC 17895 достаточно далека от группы *R. qingshengii*. Интересно, что один из первых описанных штаммов-нефтедеструкторов *R. jostii* RHA1 очень близок к неидентифицированному *Rhodococcus* sp. DK17.

Кластеры деструкции алканов

В геномах описанных штаммов *Rhodococcus* ген *alkB* обычно расположен в кластере с генами, кодирующими

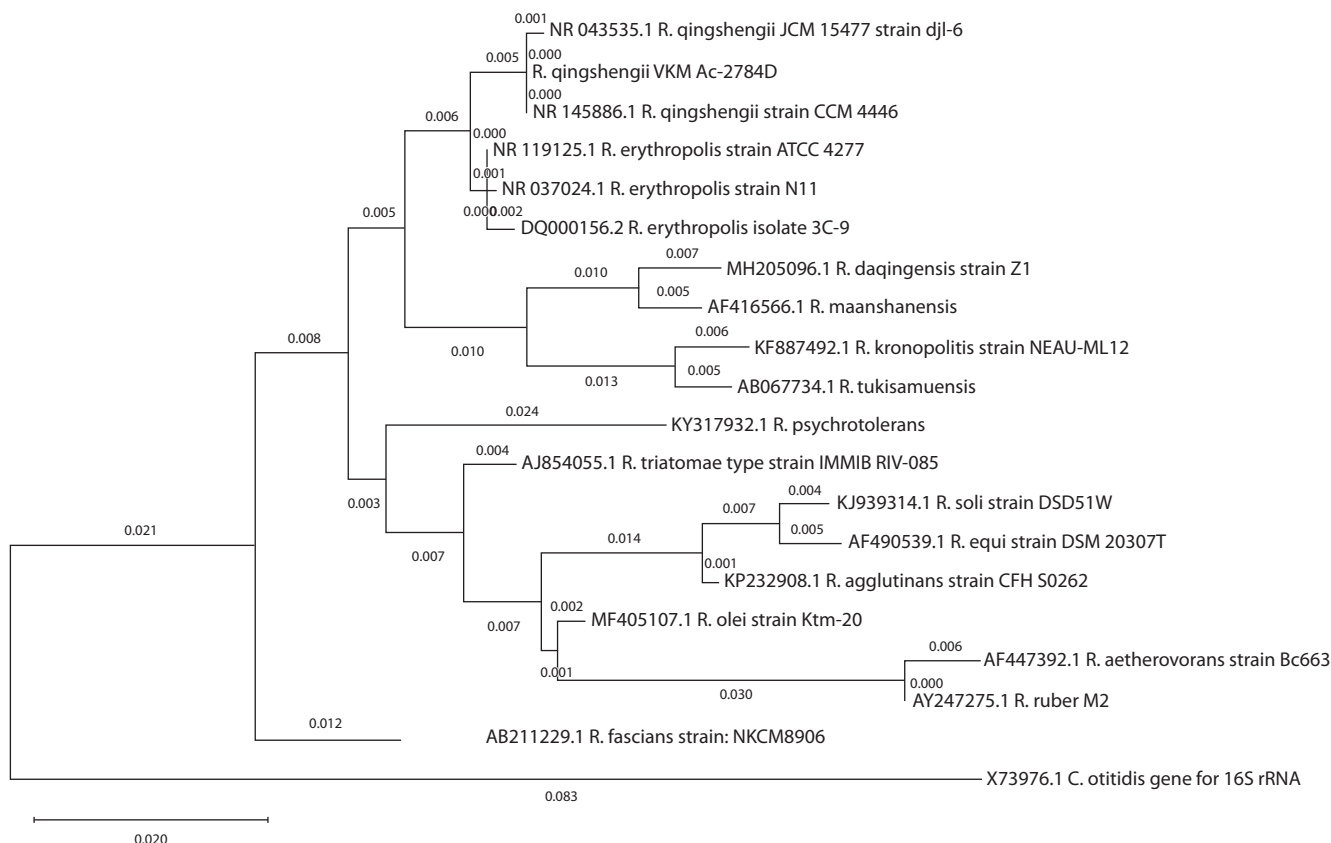


Рис. 1. Филогенетическое дерево для *R. qingshengii* VKM Ac-2784D и родственных видов.

При построении использованы последовательности фрагментов 16S рРНК. Идентификаторы доступа для NCBI GenBank указаны слева от наименований штаммов.

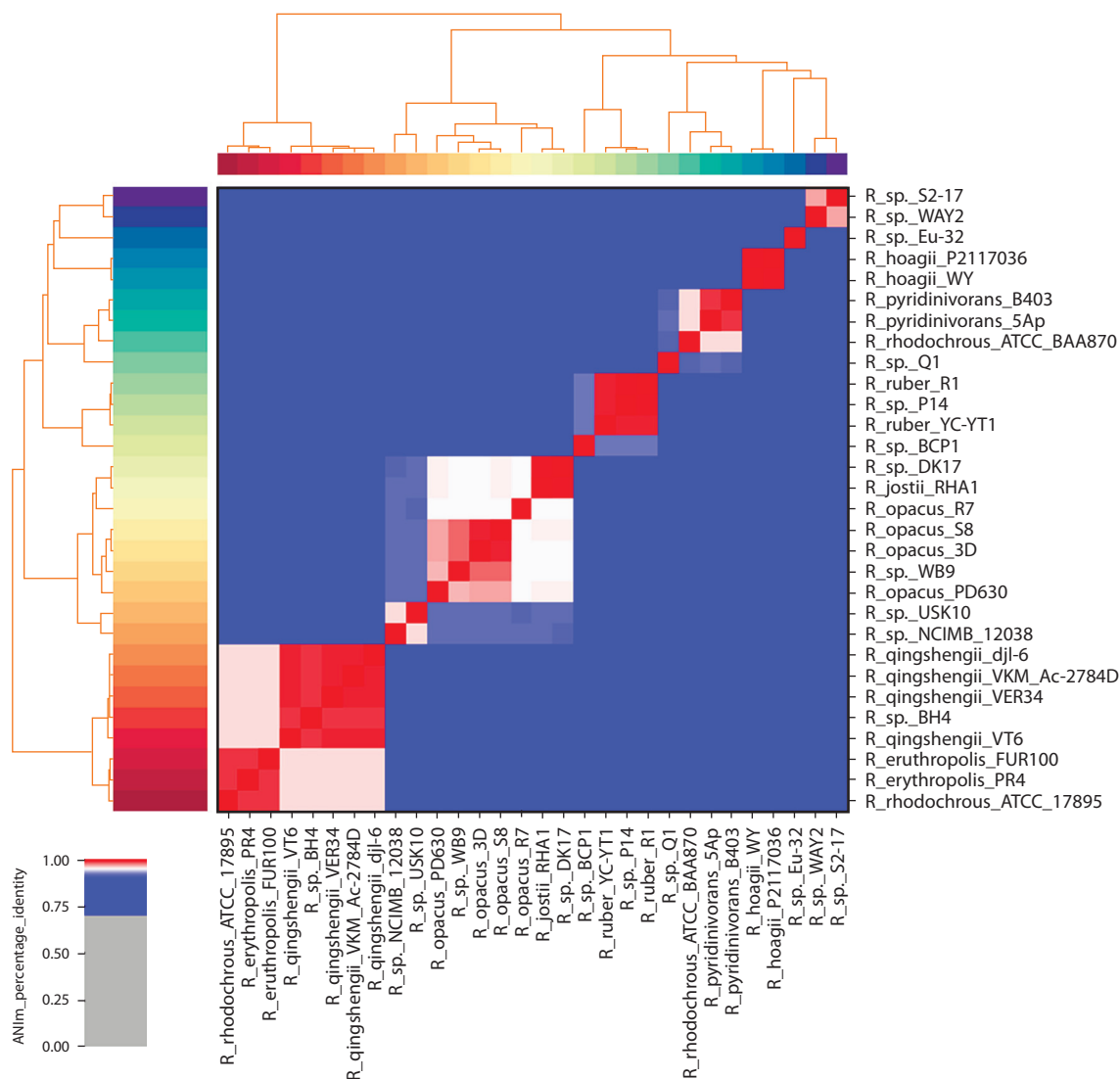


Рис. 2. Тепловая карта и филогенетическое дерево для *R. qingshengii* VKM Ac-2784D и других представителей с выраженной активностью к деградации компонентов нефти.

Шкала ANI_m_percentage_identity показывает степень сходства соответствующей пары геномов (от 0 до 1).

рубредоксин (*alkG1*, *alkG2* или *rubA1*, *rubA2*) или рубредоксин редуктазу (*alkT* или *rubB*) (Whyte et al., 2002). В геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D имеются два кластера, содержащих гены алкан-монооксигеназы и рубредоксинов (рис. 3). Обнаружены также пять отдельно расположенных генов *alkB* – три в хромосоме и два в плазмиде. Также в геноме аннотированы 14 генов цитохрома P450 (11 в хромосоме и 3 в плазмиде). Гены, кодирующие SDIMO, не найдены.

Центральные пути деградации ароматических соединений

У *R. qingshengii* VKM Ac-2784D выявлены четыре центральных пути деградации: β-кетoadипатный, фенилацетатный, 2-гидроксипентадиеноатный и гомогентизатный. Структура генных кластеров (рис. 4) сходна с описанными в литературе штаммами *R. jostii* RHA1 и *R. ruber* Chol-4 (Navarro-Llorens et al., 2005; Yam et al., 2010; Gibu et al., 2019; Guevara et al., 2019).

Периферические пути деградации ароматических соединений

Расщепление ароматического кольца обычно осуществляется диоксигеназными системами Риска 2Fe-2S, которые участвуют в деградации бифенила, полихлорированного бифенила, этилбензола и нафталина (кластеры, включающие гены *bph*, *etb* и *nah*). Они обладают широким диапазоном субстратной специфичности и могут присутствовать в геноме родококков одновременно (Shumkova et al., 2015). В геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D обнаружено 88 предполагаемых оксигеназ: 25 диоксигеназ и 63 монооксигеназы.

Из периферических путей в хромосоме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D присутствуют кластер генов, кодирующих белки деградации бензойной кислоты, ген бифенил 2,3-диоксигеназы и два гена бифенил 2,3-диол 1,2-диоксигеназы, участвующие в катаболизме бифенила. Структура генного кластера (*bphABCDK*) представлена на рис. 5. Найдены также гены диоксигеназ, осуществляющих ин-

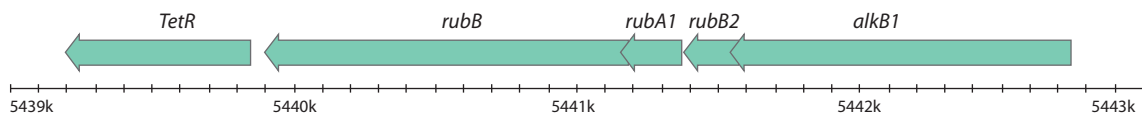


Рис. 3. Организация генного кластера в хромосоме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, кодирующего монооксигеназы, рубредоксин и рубредоксинредуктазу.

Здесь и на рис. 4 и 5 стрелки указывают направление транскрипции.

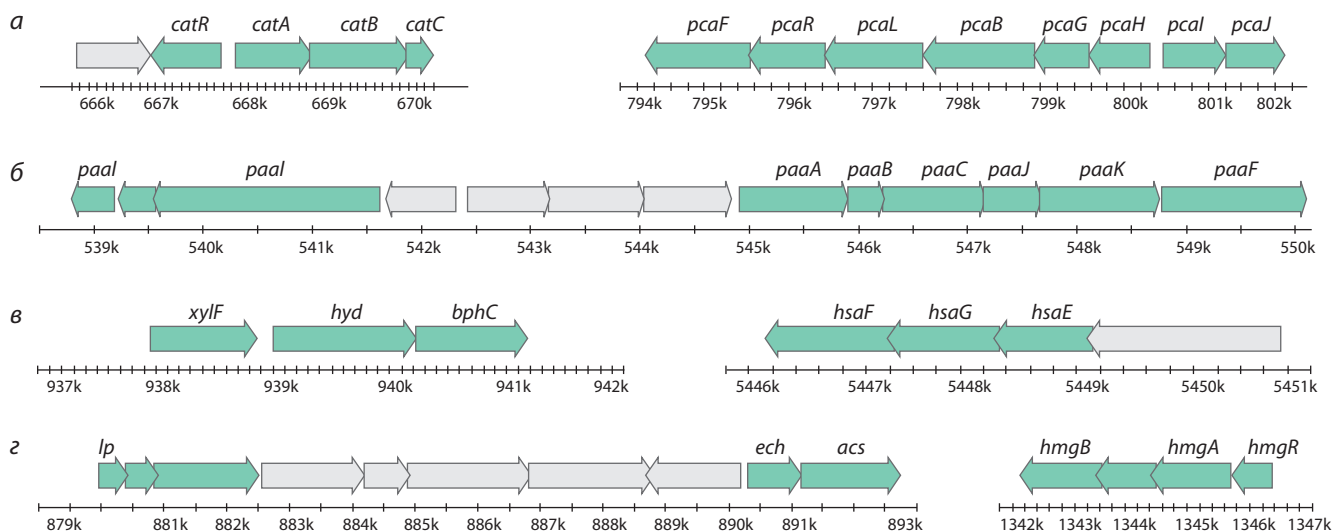


Рис. 4. Организация кластеров центральных путей деградации ПАУ: β -кетoadипатного (а), фенилацетатного (б), 2-гидроксипентадиеноатного (в) и гомогентизатного (г) путей, найденных в геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D.

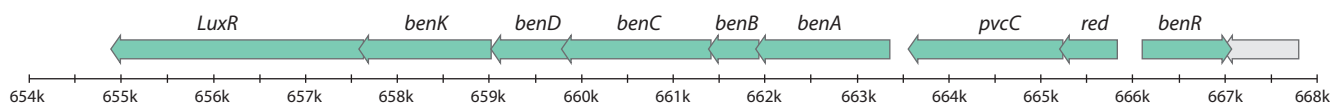


Рис. 5. Организация кластеров генов, кодирующих периферические пути деградации ПАУ: деградация бензойной кислоты.

традиционное и экстрадиальное расщепление ароматического кольца. Кластер генов *tmo*, участвующий в превращении толуола в *n*-крезол, у *R. qingshengii* VKM Ac-2784D отсутствует.

Синтез биосурфактантов

Для некоторых видов *Rhodococcus* описаны генные кластеры, связанные с синтезом биосурфактантов на основе трегалозы. Первые работы, в которых рассмотрены возможные пути синтеза, касаются патогенных бактерий *Mycobacterium tuberculosis* (De Smet et al., 2000). Аналогичные пути подтверждены и для родококков (Retamal-Morales et al., 2018). В геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D присутствуют гены *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, кодирующие белки биосинтеза сурфактантов.

Обсуждение

Способность исследуемого штамма *R. qingshengii* VKM Ac-2784D утилизировать компоненты нефти, ПАУ и другие поллютанты подтверждена нами в ряде экспериментальных работ (Tretyakova et al., 2019a, b; Belove-

zhets et al., 2020). Ранее нами было показано, что *R. qingshengii* VKM Ac-2784D преимущественно метаболизирует алкановую фракцию нефти, отдавая предпочтение алканам с длиной цепи C_{14} – C_{24} (Belovezhets et al., 2021a). В то же время мы отмечаем достаточно высокую активность в отношении ароматических соединений, что подтверждается и разложением модельных соединений нефти (Belovezhets et al., 2021b). Одним из возможных механизмов подобной метаболической активности может служить синтез биосурфактантов. Исследованный штамм является хорошим продуцентом биоПАВ как внеклеточных, так и клеточно-связанных форм. Максимальный синтез внеклеточных биосурфактантов, выявленный нами без оптимизации питательной среды, составил почти 1.5 г/л (Belovezhets et al., 2021b).

Чтобы определить некоторые механизмы деградации алканов и ароматических соединений, мы провели секвенирование генома и анализ генных кластеров, связанных с соответствующими метаболическими путями.

В последние годы секвенирование бактериального генома стало рутинной задачей, доступной для любой

микробиологической лаборатории. Аннотация многих генов, связанных с нефтедеструкцией, выполняется автоматически при публикации генома в NCBI GenBank системой Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Это позволяет определить часть генных кластеров уже на этапе первичного биоинформационного анализа. Дальнейший поиск выполнялся нами по литературным данным (Navarro-Llorens et al., 2005; Yam et al., 2010; Guevara et al., 2019). Мы обнаружили, что в геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D содержится четыре из восьми известных центральных путей деструкции ароматических соединений. Ферменты деструкции алканов представлены в виде двух кластеров, содержащих гены алканмоноксигеназы и рубредоксинов, пяти отдельно расположенных генов *alkB* (трех в хромосоме и двух в плазмиде). Присутствие генов бифенил 2,3-диоксигеназы, кластера генов бензоатного и 2-гидроксипентадиеноатного путей свидетельствует о потенциальной способности *R. qingshengii* VKM Ac-2784D деструктировать полихлорированные бифенилы.

Детальные сведения о рассмотренных генах и присутствии их в геномах исследуемых штаммов приведены в Приложении¹. Для штамма *R. qingshengii* VKM Ac-2784D указаны локусы, соответствующие функциональным генам, ссылки на экспериментальные работы, а также степень сходства белковых последовательностей. Если рассматривать сходство генных кластеров в целом, то к исследуемому штамму наиболее близки 7 из 29 рассматриваемых родственных штаммов. В электронном Приложении их наименования отмечены серым цветом: *R. ruber* YC-YT1, *R. qingshengii* VER34, *R. qingshengii* VT6, *R. qingshengii* djl-6-2, *Rhodococcus* sp. PR4, *Rhodococcus* sp. BH4, *R. rhodochrous* ATCC 17895.

Данные биоинформационного анализа согласуются с результатами биохимических исследований. Нами получена комплексная характеристика штамма родококка, позволяющая целенаправленно использовать этот микроорганизм для деструкции тех или иных загрязнителей.

Заключение

К настоящему времени расшифрованы пути и идентифицированы гены деструкции многих загрязнителей. Знание метаболического потенциала отдельного организма, полученное в результате анализа генома, позволит создавать адаптированные к заданным условиям смеси бактериальных штаммов, объединяющие микроорганизмы с разным спектром метаболических путей деструкции. Для оценки способности рассматриваемого штамма к деградации нефти и нефтепродуктов мы исследовали генные кластеры, ассоциированные с такой способностью. Структура генных кластеров сходна с описанными в литературе штаммами *R. jostii* RHA1 и *R. ruber* Chol-4. Ферменты деструкции алканов представлены двумя кластерами и пятью отдельно расположенными генами *alkB*. Усилить активность биодеструкции загрязнителей помогают сурфактанты, улучшающие доступность разлагаемых веществ. Несомненно, эффективность таких биопрепаратов надо оценивать в условиях эксперимента.

¹ Приложение см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx10.pdf>

Список литературы / References

- Belovezhets L.A., Makarova L.A., Tretyakova M.S., Markova Yu.A., Dudareva L.V., Semenova N.V. Possible pathways for destruction of polycyclic aromatic hydrocarbons by some oil-degrading bacteria isolated from plant endosphere and rhizosphere. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017;53(1):68-72. DOI 10.1134/S0003683817010069.
- Belovezhets L.A., Markova Yu.A., Tretyakova M.S., Klyba L.V., Sanzhcheva E.R. Destruction of an oil paraffin fraction by microorganisms. *Chem. Technol. Fuels Oils.* 2021a;56(6):919-925. DOI 10.1007/s10553-021-01208-z.
- Belovezhets L.A., Tretyakova M.S., Markova Yu.A. Physicochemical properties of biosurfactants produced by oil destructor microorganisms. *Chem. Sustain. Dev.* 2021b;29(1):20-25. DOI 10.15372/csd2021273.
- Belovezhets L.A., Tretyakova M.S., Markova Yu.A., Levchuk A.A. Use of rhizosphere microorganisms for bioremediation of oil contaminated soils. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2020;408:012086. DOI 10.1088/1755-1315/408/1/012086.
- Coleman N.V., Yau S., Wilson N.L., Nolan L.M., Migocki M.D., Ly M., Crossett B., Holmes A.J. Untangling the multiple monooxygenases of *Mycobacterium chubuense* strain NBB4, a versatile hydrocarbon degrader. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011;3(3):297-307. DOI 10.1111/j.1758-2229.2010.00225.x.
- Deloger M., El Karoui M., Petit M.A. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *J. Bacteriol.* 2009;191(1):91-99. DOI 10.1128/JB.01202-08.
- De Smet K.A.L., Weston A., Brown I.N., Young D.B., Robertson B.D. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology.* 2000;146(1):199-208. DOI 10.1099/00221287-146-1-199.
- Garrido-Sanz D., Redondo-Nieto M., Martin M., Rivilla R. Comparative genomics of the *Rhodococcus* genus shows wide distribution of biodegradation traits. *Microorganisms.* 2020;8(5):774. DOI 10.3390/microorganisms8050774.
- Gibu N., Kasai D., Ikawa T., Akiyama E., Fukuda M. Characterization and transcriptional regulation of *n*-alkane hydroxylase gene cluster of *Rhodococcus jostii* RHA1. *Microorganisms.* 2019;7(11):479. DOI 10.3390/microorganisms7110479.
- Guevara G., Lopez M.-C., Alonso S., Perera J., Navarro-Llorens M. New insights into the genome of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *BMC Genomics.* 2019;20(1):332. DOI 10.1186/s12864-019-5677-2.
- Gürtler V., Seviour R.J. Systematics of members of the genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998. In: Alvarez H. (Ed.) *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs. Vol. 16. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010;1-28. DOI 10.1007/978-3-642-12937-7_1.
- Kumar S., Stecher G., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments. In: Alvarez H. (Ed.) *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs. Vol. 16. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010;231-262. DOI 10.1007/978-3-642-12937-7_9.
- Martínková L., Uhnáková B., Nesvera J., Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ. Int.* 2009;35(1):162-177. DOI 10.1016/j.envint.2008.07.018.
- Navarro-Llorens J.M., Patrauchan M.A., Stewart G.R., Davies J.E., Eltis L.D., Mohn W.W. Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J. Bacteriol.* 2005;187(13):4497-4504. DOI 10.1128/JB.187.13.4497-4504.2005.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Overbeek R., Olson R., Pusch G., Olsen G., Davis J., Disz T., Edwards R., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A., Xia F., Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):D206-D214. DOI 10.1093/nar/gkt1226.

- Pericard P., Dufresne Y., Couderc L., Blanquart S., Touzet H. MATAM: reconstruction of phylogenetic marker genes from short sequencing reads in metagenomes. *Bioinformatics*. 2018;34(4):585-591. DOI 10.1093/bioinformatics/btx644.
- Petrushin I.S., Markova Yu.A., Karepova M.D., Zaytseva Y.V., Belovezhets L.A. Complete genome sequence of *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D, isolated from *Elytrigia repens* rhizosphere. *Microbiol. Resour. Announc.* 2021;10(11):e00107-21. DOI 10.1128/mra.00107-21.
- Retamal-Morales G., Heine T., Tischler J.S., Erler B., Groning J.A.D., Kaschaber S.R., Schlomann M., Levican G., Tischler D. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* B7g, a biosurfactant producing actinobacterium. *J. Biotechnol.* 2018;280:38-41. DOI 10.1016/J.JBIOTEC.2018.06.001.
- Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(45):19126-19131. DOI 10.1073/pnas.0906412106.
- Sangal V., Goodfellow M., Jones A.L., Seviour R.J., Sutcliffe I.C. Refined systematics of the genus *Rhodococcus* based on whole genome analyses. In: Alvarez H. (Ed.) *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs. Vol. 16. Cham: Springer, 2019;1-21. DOI 10.1007/978-3-030-11461-9_1.
- Shumkova E.S., Egorova D.O., Boronnikova S.V., Plotnikova E.G. Polymorphism of the *bphA* genes in bacteria destructing biphenyl/chlorinated biphenils. *Mol. Biol.* 2015;49(4):569-580. DOI 10.1134/S0026893315040159.
- Táncsics A., Benedek T., Szoboszlay S., Veres P.G., Farkas M., Mathe I., Marialigeti K., Kukolya J., Lanyi S., Kriszt B. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2015;38(1):1-7. DOI 10.1016/j.syapm.2014.10.010.
- Tretyakova M.S., Ivanova M.V., Belovezhets L.A., Markova Yu.A. Possible use of oil-degrading microorganisms for protection of plants growing under conditions of oil pollution. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2019a;315:072046. DOI 10.1088/1755-1315/315/7/072046.
- Tretyakova M.S., Markova Yu.A., Belovezhets L.A. Microbial preparation for bioremediation of soil contaminated with oil and oil products. 2019b. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2705290C1/en>.
- Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(12):5933-5942. DOI 10.1128/AEM.68.12.5933-5942.2002.
- Yam K.C., van der Geize R., Eltis L.D. Catabolism of aromatic compounds and steroids by *Rhodococcus*. In: Alvarez H. (Ed.) *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs. Vol. 16. Berlin; Heidelberg: Springer, 2010;133-169. DOI 10.1007/978-3-642-12937-7_6.
- Zampolli J., Zeaiter Z., Di Canito A., Di Gennaro P. Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103:1069-1080. DOI 10.1007/s00253-018-9539-7.

ORCID ID

Yu.A. Markova orcid.org/0000-0001-7767-4204
I.S. Petrushin orcid.org/0000-0002-8788-5352
L.A. Belovezhets orcid.org/0000-0001-5922-3397

Благодарности. Работа выполнена в рамках базовой тематики госзадания FWSS-2022-0004, номер госрегистрации 122041100050-6. Расчеты выполнены на оборудовании ЦКП «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.05.2022. После доработки 05.09.2022. Принята к публикации 06.09.2022.

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

Компиляция и функциональная классификация генов, ассоциированных с длиной теломер, у человека и других видов животных

Е.В. Игнатьева , Н.С. Юдин, Д.М. Ларкин 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 eignat@bionet.nsc.ru; dmlarkin@gmail.com

Аннотация. Теломеры – это концевые участки хромосом, обеспечивающие их стабильность в ходе клеточного деления. Укорочение теломер инициирует процесс старения клеток, что может приводить к дегенерации и атрофии тканей. Укорочение теломер связано с сокращением продолжительности жизни и с предрасположенностью к ряду заболеваний, поэтому данный показатель может быть использован в качестве предиктора продолжительности жизни и состояния здоровья отдельного индивида. Длина теломер – сложный фенотипический признак, который определяется многими факторами, в том числе генетическими. Многочисленные исследования (включая полногеномный анализ ассоциаций, ПГАА) свидетельствуют о полигенном характере контроля длины теломер. Цель работы – охарактеризовать генетические основы регуляции длины теломер на основе данных ПГАА, полученных при исследовании различных популяционных выборок человека и других животных. Для этого авторами была собрана компиляция генов, ассоциированных с длиной теломер по данным ПГАА, которая включала сведения о 270 генах человека, а также 23, 22 и 9 генах, выявленных у крупного рогатого скота, домового воробья и нематоды соответственно. Среди них присутствовали два гена-ортолога, кодирующих белок шелтеринового комплекса (*POT1* у человека и *pot-2* у *C. elegans*). Функциональный анализ показал, что на длину теломер могут влиять генетические варианты в генах, кодирующих: 1) структурные компоненты теломеразы; 2) белковые компоненты теломерных участков хромосом (шелтериновый комплекс и CST комплекс); 3) белки, участвующие в биогенезе теломеразы и регулирующие ее активность; 4) белки, регулирующие функциональную активность компонентов шелтеринового комплекса; 5) белки, участвующие в репликации и/или экпировании теломер; 6) белки, контролирующие альтернативный путь удлинения теломер; 7) белки, реагирующие на повреждения ДНК и отвечающие за репарацию; 8) компоненты РНК экзосом. В работе выявлены гены человека, идентифицированные несколькими исследовательскими группами в популяциях различного этнического происхождения. Это гены, кодирующие компоненты теломеразы (*TERC* и *TERT*), а также ген *STN1*, кодирующий белок CST комплекса. По-видимому, полиморфные локусы, затрагивающие функции этих генов, могут быть наиболее надежными маркерами предрасположенности к заболеваниям, связанным с длиной теломер. Систематизированные нами данные о генах и их функциях будут полезны при разработке прогностических критериев заболеваний человека, для которых показана связь с длиной теломер. Сведения о генах и процессах, контролирующих длину теломер, могут быть востребованы для маркер-ориентированной и геномной селекции сельскохозяйственных животных, направленной на повышение продолжительности их хозяйственного использования.

Ключевые слова: длина теломер; гены-кандидаты; полногеномный анализ ассоциаций; функциональный анализ.

Для цитирования: Игнатьева Е.В., Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Компиляция и функциональная классификация генов, ассоциированных с длиной теломер, у человека и других видов животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3):283-292. DOI 10.18699/VJGB-23-34

Compilation and functional classification of telomere length-associated genes in humans and other animal species

E.V. Ignatieva , N.S. Yudin, D.M. Larkin 

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 eignat@bionet.nsc.ru; dmlarkin@gmail.com

Abstract. Telomeres are the terminal regions of chromosomes that ensure their stability while cell division. Telomere shortening initiates cellular senescence, which can lead to degeneration and atrophy of tissues, so the process is associated with a reduction in life expectancy and predisposition to a number of diseases. An accelerated rate of telomere attrition can serve as a predictor of life expectancy and health status of an individual. Telomere length is a complex phenotypic trait that is determined by many factors, including the genetic ones. Numerous studies (includ-

ing genome-wide association studies, GWAS) indicate the polygenic nature of telomere length control. The objective of the present study was to characterize the genetic basis of the telomere length regulation using the GWAS data obtained during the studies of various human and other animal populations. To do so, a compilation of the genes associated with telomere length in GWAS experiments was collected, which included information on 270 human genes, as well as 23, 22, and 9 genes identified in the cattle, sparrow, and nematode, respectively. Among them were two orthologous genes encoding a shelterin protein (*POT1* in humans and *pot-2* in *C. elegans*). Functional analysis has shown that telomere length can be influenced by genetic variants in the genes encoding: (1) structural components of telomerase; (2) the protein components of telomeric regions (shelterin and CST complexes); (3) the proteins involved in telomerase biogenesis and regulating its activity; (4) the proteins that regulate the functional activity of the shelterin components; (5) the proteins involved in telomere replication and/or capping; (6) the proteins involved in the alternative telomere lengthening; (7) the proteins that respond to DNA damage and are responsible for DNA repair; (8) RNA-exosome components. The human genes identified by several research groups in populations of different ethnic origins are the genes encoding telomerase components such as *TERC* and *TERT* as well as *STN1* encoding the CST complex component. Apparently, the polymorphic loci affecting the functions of these genes may be the most reliable susceptibility markers for telomere-related diseases. The systematized data about the genes and their functions can serve as a basis for the development of prognostic criteria for telomere length-associated diseases in human. Information about the genes and processes that control telomere length can be used for marker-assisted and genomic selection in the farm animals, aimed at increasing the duration of their productive lifetime.

Key words: telomere length; candidate genes; genome-wide association study; functional classification.

For citation: Ignatieva E.V., Yudin N.S., Larkin D.M. Compilation and functional classification of telomere length-associated genes in humans and other animal species. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):283-292. DOI 10.18699/VJGB-23-34

Введение

Теломеры – это концевые участки хромосом, обеспечивающие их стабильность. Теломеры представлены эволюционно консервативными, tandemно повторяющимися последовательностями ДНК (у позвоночных животных это повтор гексануклеотида TTAGGG), имеющими протяженность несколько тысяч пар нуклеотидов (Podlevsky et al., 2008; Monaghan, Ozanne, 2018). Например, у человека при рождении их длина составляет 10–15 тыс. пар оснований (Jafri et al., 2016). 3'-терминальный конец теломер представлен одноцепочечным гуанин-богатым участком ДНК (150–200 нуклеотидов), конец которого взаимодействует с двуцепочечным участком, благодаря чему на конце теломеры образуется петля (Т-петля). Формирование и стабилизация Т-петли обеспечиваются шелтериновым белковым комплексом (рис. 1). Такая структура препятствует распознаванию концевой участка хромосомы белками репарации (de Lange, 2018).

В ходе клеточного деления ДНК-полимераза не может полностью реплицировать 3'-конец линейной ДНК, что приводит к потере 50–200 нуклеотидов из теломерной последовательности при каждом клеточном делении (Fan et al., 2021). Укорочению теломер могут также способствовать другие факторы и процессы (Приложение 1)¹, например окислительный стресс, воспаление, облучение ультрафиолетом, воздействие токсических веществ, ошибки в репликации ДНК и т. д. (Aviv, Shay, 2018; Monaghan, Ozanne, 2018). Влияние этих факторов, вероятно, различается в зависимости от типа клеток, а также от стадии развития организма и его видовой принадлежности (Monaghan, Ozanne, 2018).

Укорочение теломер инициирует процесс старения клеток. При этом в результате активации сигнальных путей ответа на поврежденную ДНК происходит остановка клеточного цикла, и в дальнейшем клетки могут подвергаться

апоптозу, что может привести к прогрессирующей дегенерации тканей (Jafri et al., 2016; Aviv, Shay, 2018; Monaghan, Ozanne, 2018). Данные подобного рода, полученные *in vitro* на клеточном уровне и на модельных организмах, легли в основу представления о том, что длина теломер может быть использована в качестве предиктора продолжительности жизни и состояния здоровья отдельного индивида. Действительно, исследования на человеке (Cocco et al., 2021), мышах (Vera et al., 2012), овцах (Wilbourn et al., 2018), крупном рогатом скоте (КРС) (Seeker et al., 2021), диких птицах (Bichet et al., 2020) и других животных показали, что более короткая длина теломер может быть связана с сокращением продолжительности жизни. Исследования на человеке выявили ассоциацию между длиной теломер и заболеваниями сердечно-сосудистой системы, раком, диабетом, воспалением и другими патологическими состояниями (Kong et al., 2013; Jafri et al., 2016; Aviv, Shay, 2018).

Укорочению теломер препятствует теломераза – специализированный рибонуклеопротеиновый комплекс, выполняющий функцию обратной транскриптазы. У человека теломераза активна почти во всех исследованных раковых клетках (Jafri et al., 2016), в бластоцисте, в большинстве соматических тканей на 16–20-й неделе развития (за исключением клеток мозга), а также в клетках яичников и семенников на всех этапах онтогенеза (за исключением зрелых сперматозоидов и ооцитов) (Wright et al., 1996).

Активность теломеразы контролируется белками, регулирующими экспрессию компонент теломеразы, их перемещение в различные компартменты клетки, процессинг, сборку, а также белками, поддерживающими стабильность теломеразного комплекса или, наоборот, активирующими его деградацию (Egan, Collins, 2012; Tseng et al., 2015; Schrumfová, Fajkus, 2020). Основные этапы биогенеза теломеразы представлены на рис. 2, а примеры белков, влияющих на активность теломеразы, – в Приложении 2.

¹ Приложения 1–11 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx11.pdf>

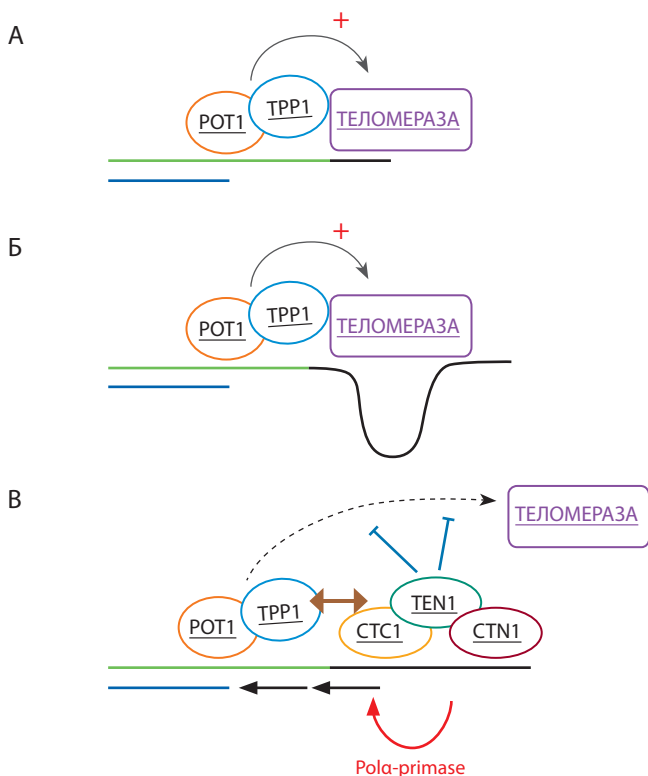


Рис. 3. Роль белков CST комплекса в регуляции активности теломеразы на поздней стадии перехода от S к G2 фазе клеточного цикла.

Согласно пятишаговому механизму, описанному в (Chen et al., 2012), на первом шаге (*Recruitment*, здесь не показан) белки шелтеринового комплекса рекрутируют теломеразу и добавочное количество белков ACD/TPP1 и POT1. Затем теломераза начинает наращивать одноцепочечный участок молекулы ДНК (шаг 2, *Extension I*) (показано на панели А, участок вновь синтезированной ДНК отображен черной линией). Далее (шаг 3, *Extension II*) происходит дальнейшее наращивание одноцепочечного участка молекулы ДНК (показано на панели Б). Со вновь синтезированным одноцепочечным участком ДНК (~60 нуклеотидов) взаимодействуют белки CST комплекса, препятствуя стимулирующему действию белков ACD/TPP1 и POT1 на теломеразу (шаг 4, *Termination*) и активируя синтез С-нити ДНК ферментом ДНК-полимеразой/а-праймазой (Pola-primase) (шаг 5, *Fill-in*). События, относящиеся к шагу 4 и шагу 5, представлены на панели В. Подчеркиванием выделены названия белков, соответствующих генам человека, ассоциированным с длиной теломер по данным ПГАА.

ках, выявленных у млекопитающих), содержатся в интернет-ресурсе The Telomerase Database (<http://telomerase.asu.edu/>) (Podlevsky et al., 2008). В работе (Joyce et al., 2018) представлен набор из 80 генов человека, функция которых связана с теломерами.

Данные, полученные с помощью методики ПГАА, тоже свидетельствуют о полигенном характере наследования длины теломер. Так, ресурс GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) содержит сведения о 99 генах человека, либо содержащих, либо расположенных рядом с аллельными вариантами, ассоциированными с длиной теломер. В одном из наиболее масштабных исследований, проведенных методом ПГАА, представлена информация о 138 локусах генома человека, аллельные варианты которых ассоциированы с длиной теломер (Codd et al., 2021).

Наряду с данными по ассоциациям длины теломер, полученными на основе ПГАА на различных популяционных выборках человека, представляют интерес сведения,

полученные на других видах животных. Однако исследования подобного рода немногочисленны. ПГАА был проведен на КРС голштинско-фризской породы (Iska-Warner et al., 2019), домовых воробьях (Pepke et al., 2021) и нематоде *Caenorhabditis elegans* (Cook et al., 2016).

Цель работы – охарактеризовать генетические основы регуляции длины теломер на основе данных ПГАА, полученных при исследовании различных популяционных выборок человека, и сопоставить их с результатами подобных экспериментов, полученными для других видов животных. Для достижения этой цели нами были систематизированы сведения о генах, выявленных в экспериментах ПГАА с длиной теломер; проведена функциональная аннотация генов и идентифицирован набор биологических процессов, влияющих на длину теломер.

Материалы и методы

Данные о генах, ассоциированных с длиной теломер, получены из научных публикаций, найденных в базе PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) по ключевым словам 'telomere length' и 'GWAS'. Функциональную аннотацию генов проводили с использованием информации из статей, представляющих данные ПГАА, запросов к базам данных PubMed и The Telomerase Database (<http://telomerase.asu.edu/>), а также с помощью интернет-ресурса DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) (Sherman et al., 2022).

Результаты и обсуждение

Гены человека, выявленные в экспериментах по ПГАА

В результате запросов к PubMed было найдено 18 научных публикаций, представляющих результаты поиска полиморфных локусов в геноме человека, ассоциированных с длиной теломер по данным ПГАА. На основе анализа этих публикаций собраны данные о 270 генах, ассоциированных с длиной теломер (Приложение 3). Большинство генов (262) было идентифицировано при анализе популяционных выборок европейского происхождения, для 15 генов имелись данные исследований, проведенных на выборках индивидов из Юго-Восточной Азии (выходцах из Китая, Бангладеш, Индии), пять генов выявлено при изучении ассоциаций на межэтнической популяционной выборке (сингапурцы китайского происхождения и европейцы) (Dorajoo et al., 2019), один ген найден у афроамериканцев (Zeiger et al., 2018).

Сведения о функциональной значимости в контексте регуляции длины теломер были предоставлены авторами исследований по ПГАА для 52 генов из 270 (см. Приложение 3). Тот факт, что данные о значимости генов в контексте регуляции длины теломер имелись не для всех локусов, отражает особенности методики ПГАА. Большинство из локусов, выявляемых ПГАА и ассоциированных с признаком, находятся в межгенных участках. В таких случаях в число генов-кандидатов принято включать наиболее близко расположенные гены, функциональную значимость которых часто бывает трудно интерпретировать. Для идентификации механизмов и генов, посредством которых межгенные варианты влияют на исследуемый признак, необходимы дополнительные эксперименты. Например, таким образом было показано,

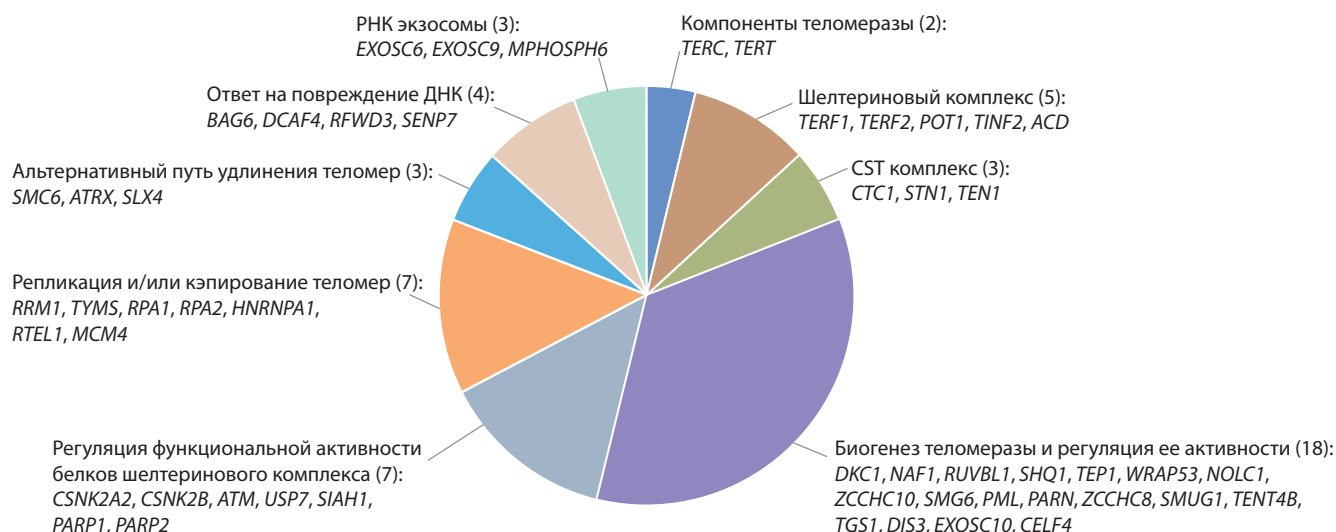


Рис. 4. Функциональные группы генов, ассоциированных с длиной теломер у человека.

Представлена классификация для 52 генов, роль которых в регуляции длины теломер охарактеризована в Приложении 4. В скобках указано количество генов в каждой группе.

что замена Т→С в локусе rs1421085, расположенном в интроне гена *FTO*, влияет на экспрессию генов *IRX3* и *IRX5*, старты транскрипции которых удалены от локуса rs1421085 на расстояние ~520 тыс. и ~1160 тыс. п. н. соответственно (Claussnitzer et al., 2015).

Основные функциональные группы генов, ассоциированных с длиной теломер у человека

Нами проведена функциональная классификация набора из 52 генов человека, для которых имелись сведения о функциональной значимости в контексте регуляции длины теломер (Приложение 4). Выявлено несколько функциональных групп генов (рис. 4).

Гены, кодирующие компоненты теломеразы: *TERC* – РНК-компонент теломеразы, который является матрицей, на основе которой происходит наращивание цепи ДНК на конце теломеры, и *TERT* – субъединица фермента обратной транскриптазы (Egan, Collins, 2012; Tseng et al., 2015).

Гены, кодирующие белки шелтеринового комплекса. Компоненты этого комплекса (*TERF1/TRF1*, *TERF2/TRF2*, *POT1*, *TERF2IP/Rap1/DRIP5*, *TINF2/TIN2* и *ACD/TPP1/TINT1*) связываются как с двуцепочечными, так и с одноцепочечными теломерными участками ДНК (см. рис. 1), стабилизируют их, делают малодоступными для теломеразы, предохраняют от действия экзонуклеаз, а также блокируют белки, активируемые поврежденной ДНК и участвующие в восстановлении двуцепочечных разрывов (Diotti, Loayza, 2011; de Lange, 2018). Данные ПГАА об ассоциации с длиной теломер были получены для генов, кодирующих пять из шести белков комплекса (*TERF1*, *TERF2*, *POT1*, *TINF2* и *ACD/TPP1/TINT1*) (см. рис. 4, Приложение 4).

Гены, кодирующие белки CST комплекса: *CTC1*, *STN1*, *TEN1*. CST комплекс является негативным регулятором теломеразы на поздней стадии перехода от S к G2 фазе клеточного цикла (см. рис. 3) (Chen et al., 2012).

Гены, кодирующие белки, участвующие в биогенезе теломеразы и регулирующие ее активность. Один из генов, *ZCCHC10*, кодирует белок, регулирующий образование теломеразы на уровне транскрипции: белок *ZCCHC10* подавляет транскрипцию гена *TERT* (Ohira et al., 2019). В процессинге и сборке РНК-субъединицы теломеразы участвуют белки *DKC1*, *NAF1*, *SHQ1* (Egan, Collins, 2012), рибонуклеаза *PARN*, экзорибонуклеаза *DIS3*, белок *ZCCHC8* (компонент ядерного экзосомного комплекса NEXT) (Tseng et al., 2015), а также белки *SMUG1* (Kroustallaki et al., 2019) и *CELF4/BRUNOL4* (Mangino et al., 2009). Снижению уровня РНК-компоненты теломеразы способствуют неканоническая полимераз *TENT4B/PAPD5* (Nagpal et al., 2020), триметилгуанозин синтетаза *TGS1* (Chen et al., 2020) и компонент РНК экзосом *EXOSC10* (Stuparević et al., 2021). В сборке нуклеопротеинового комплекса теломеразы участвуют АТФаза *RUVBL1/pontin* (Jafri et al., 2016) и ассоциированный с теломеразой белок *TEP1* (Codd et al., 2021). Еще два белка, *WRAP53/WDR79/TCAB1* и *NOLC1/NOPP140*, способствуют накоплению теломеразы в ядерных структурах (тельцах Кахаля), где осуществляются процессинг малых ядерных и ядрышковых РНК и сборка рибонуклеопротеиновых комплексов (Bizarro et al., 2019; Schruppfová, Fajkus, 2020). Модулируют активность теломеразы белок-активатор *SMG6/EST1A*, который также связывается с одноцепочечной ДНК (Snow et al., 2003), и белок *PML*, одна из изоформ которого (*PML-IV*) подавляет активность теломеразы (Oh et al., 2009).

Гены, кодирующие белки, изменяющие функциональную активность белков шелтеринового комплекса. Белки *CSNK2A2* и *CSNK2B* являются субъединицами киназы, которая фосфорилирует белок *TERF1*, повышая его связывание с теломерами (Saxena et al., 2014; Li et al., 2020). Серин-треониновая киназа *ATM*, наоборот, ослабляет связь *TERF1* с теломерной ДНК (Li et al., 2020). Пептидаза *USP7* и убиквитин-лигаза *SIAH1*

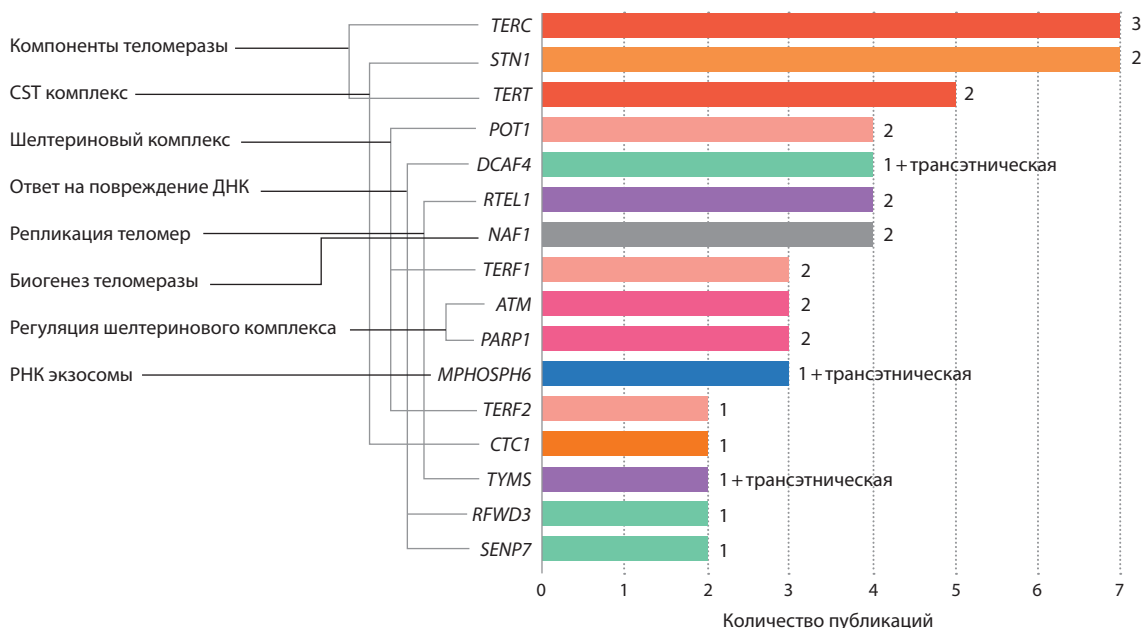


Рис. 5. Гены, сведения о которых содержатся в двух и более публикациях.

Цвет столбцов соответствует принадлежности гена к определенной функциональной группе. Цифры справа от столбцов обозначают количество этнически различных популяционных выборок, при исследовании которых данный ген был выявлен в результате ПГАА. Трансэтническая группа состояла из китайцев, проживающих в Сингапуре, и европейцев.

активируют протеасомную деградацию белков POT1 и TERF2 соответственно (Codd et al., 2021). АДФ-рибозилазы PARP1 и PARP2 снижают ДНК-связывающую способность белка TERF2 (Dorajoo et al., 2019; Codd et al., 2021).

Гены, кодирующие белки, участвующие в репликации и/или экзипировании теломер: 1) ферменты RRM1 и TYMS, участвующие в синтезе дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и тимидилатов, необходимых для синтеза ДНК (Dorajoo et al., 2019; Nersisyan et al., 2019); 2) геликазы RTEL1 и MCM4 (Codd et al., 2013, 2021); 3) белки-субъединицы белка RPA (RPA1 и RPA2), способствующие разрушению G-квадруплексных структур, препятствующих репликации (Codd et al., 2021); 4) белок HNRNPA1, облегчающий экзипирование теломерной ДНК после репликации (Codd et al., 2021).

Гены, кодирующие белки, влияющие на альтернативный путь удлинения теломер. Этот независимый от теломеразы механизм (известен как ALT – alternative lengthening of telomere, описание см. в Приложении 5) включает этап рекомбинации между теломерными участками двух молекул ДНК (Sobinoff, Pickett, 2017, 2020). В экспериментах ПГАА было выявлено три гена (см. рис. 4, Приложение 4). Эти гены кодируют SMC6 – белок-активатор ALT (Potts, Yu, 2007), а также два белка-ингибитора ALT: белок ATRX, обладающий хроматин-ремоделирующей активностью, и эндонуклеазу SLX4 (Sobinoff, Pickett, 2017).

Гены, кодирующие белки, реагирующие на повреждение ДНК: пептидаза SENP7 (Li et al., 2020); белок-шаперон BAG6 (Li et al., 2020); DCAF4, взаимодействующий с CUL4-DDB1 лигазой (Mangino et al., 2015); RFWD3, взаимодействующий с белком RPA (replication protein A) (Li et al., 2020).

Гены, кодирующие белки-компоненты РНК экзосом: EXOSC6, EXOSC9 (Codd et al., 2021) и MPHOSPH6 (Dorajoo et al., 2019). Функция этих белков значима, поскольку известно, что РНК-компонент теломеразы TERC может подвергаться 3'-процессингу и в этом процессе участвует РНК-экзосомный комплекс (Tseng et al., 2015).

Гены-кандидаты человека, идентифицированные в нескольких исследованиях

Как описано выше, мы проанализировали 18 публикаций по ПГАА, направленных на поиск геномных локусов человека, ассоциированных с длиной теломер, и собрали сведения о 270 таких генах (см. Приложение 3). При этом только 16 генов были идентифицированы хотя бы в двух исследованиях (рис. 5).

К числу наиболее часто выявляемых генов относились *TERC* и *TERT*, кодирующие обе компоненты теломеразы, а также *STN1*, кодирующий компонент CST комплекса (идентифицированы в семи, пяти и семи публикациях соответственно). Гены *POT1*, *TERF1* и *TERF2*, кодирующие компоненты шелтеринового комплекса, были выявлены в четырех, трех и двух исследованиях соответственно. В четырех исследованиях были идентифицированы также гены *DCAF4*, *RTEL1*, *NAF1*, контролирующие ответ на повреждение ДНК, репликацию теломер и биогенез теломеразы. Гены *ATM*, *PARP1*, *MPHOSPH6*, *RFWD3*, *SENP7* и *TYMS* были идентифицированы в трех либо двух исследованиях.

Большинство из 16 перечисленных генов выявлено при исследовании популяционных выборок различного этнического происхождения: *TERC* – в выборках, принадлежащих трем этносам (у европейцев, жителей Бангладеш и у китайцев, проживающих в Сингапуре); *DCAF4*,

MPHOSPH6 и *TYMS* – у европейцев, а также в трансэтнической группе (китайцы, проживающие в Сингапуре и европейцы); *TERT*, *STN1*, *POT1*, *RETL1*, *NAF1*, *TERF1*, *ATM*, *PARP1* – у двух этносов (европейцев и китайцев, проживающих в Сингапуре).

Идентификация генов, имеющих отношение к регуляции длины теломер, по данным интернет-ресурса DAVID

С помощью интернет-ресурса DAVID были найдены термины из словаря GOTERM_BP_DIRECT, неслучайно часто ($FDR < 0.05$) связанные с 270 генами человека, ассоциированными с длиной теломер (см. Приложение 3). Шестнадцать терминов, которые обозначают биологические процессы, напрямую контролируемые длину теломер, перечислены в Приложении 6, остальные пятнадцать терминов – в Приложении 7. С терминами из первой группы (см. Приложение 6) были связаны 30 генов, два из которых (*SIRT6* и *TP53*) мы не относили ранее к группе генов, имеющих биологическую интерпретацию (эти гены представлены в исследовании (Codd et al., 2021) без комментариев относительно их функциональной значимости в контексте регуляции длины теломер). Анализ научных публикаций показал, что белковые продукты обоих генов проявляют свои эффекты в субтеломерных районах хромосом (Tennen et al., 2011; Tutton et al., 2016) и опосредованно могут быть задействованы в регуляции длины теломер.

Далее были рассмотрены гены, связанные со второй группой терминов из словаря GOTERM_BP_DIRECT, выявленных при $FDR < 0.05$ (см. Приложение 7). Среди них найдено 29 генов, не имевших биологической интерпретации (Приложение 8), включая упоминавшиеся ранее *SIRT6* и *TP53*, а также *BRCA1*, *SAMHD1* и *BRCC3*, связанные с наибольшим количеством GO терминов (шесть, четыре и четыре соответственно). По-видимому, гены из полученного таким образом списка тоже могут представлять интерес в контексте регуляции длины теломер.

Гены животных, ассоциированные с длиной теломер

Полногеномный поиск локусов и генов, ассоциированных с длиной теломер, проводился у животных трех видов: крупного рогатого скота (*Bos taurus*), домового воробья (*Passer domesticus*) и нематоды (*Caenorhabditis elegans*).

Исследование для вида *Bos taurus* было проведено на 702 животных голштино-фризской породы (Iliska-Warner et al., 2019). В результате ПГАА, выполненного на ДНК из цельной крови, взятой у телок при рождении, было выявлено шесть полиморфных локусов, ассоциированных с длиной теломер, а при анализе ДНК крови телок в момент первой лактации – три других локуса. При анализе локусов количественных признаков (QTL), соответствующих обнаруженным генетическим вариантам, было идентифицировано 14 генов-кандидатов у животных при рождении и 9 генов-кандидатов у животных в момент первой лактации (см. таблицу и Приложение 9). Авторам не удалось найти данных о непосредственном участии выявленных генов в регуляции процессов, влияющих на длину теломер. К числу потенциальных регуляторов ими причислен ген нуклеопорина *NUP93*, кодирующий компонент ядерных пор, поскольку ранее было показано, что у дрожжей нуклеопорины способствуют сайленсингу генов, расположенных на близком расстоянии от теломерных областей (Van de Vosse et al., 2013).

Недавно были опубликованы результаты ПГАА (Pepke et al., 2021), проведенного на птенцах домовых воробьев (*Passer domesticus*), в результате которого найдено 22 гена-кандидата (см. таблицу и Приложение 10). По мнению авторов исследования, в контексте регуляции длины теломер могут быть интересны: 1) ген *WNT9B*, кодирующий белок-компонент сигнального пути Wnt/ β -катенина, поскольку β -катенин участвует в активации гена *Tert* в эмбриональных стволовых клетках мыши; 2) гены *CDCA4*, *GH* и *GHRHR*, контролирующие пролиферацию, апоптоз и рост организма; 3) ген *RHOF*, участвующий в процессе организации цитоскелета; 4) ген *RNF34* (E3 ubiquitin-protein ligase RNF34), контролирующей убиквитинирование; 5) ген *AQP1*, поскольку белок аквапорин участвует в транспорте оксида азота и активных форм кислорода, способствуя развитию окислительного стресса, что может повлиять на активность теломеразы; 6) ген *SCN4A*, поскольку экспрессия этого гена в стволовых клетках человека коррелирует с длиной теломер.

Проведенный нами анализ показал, что ни один из генов-кандидатов, идентифицированных у коров (23 гена) и домового воробья (22 гена) (см. таблицу), не имел ортологов среди набора, включающего 270 генов, выявленных по данным ПГАА у человека (см. Приложение 3).

Гены животных, ассоциированные с длиной теломер (дополнительные данные представлены в Приложениях 9–11)

Вид организма	Метод / источник ДНК / литературный источник	Гены-кандидаты
<i>Bos taurus</i> (телки голштино-фризской породы)	ПГАА / клетки крови телок / (Iliska-Warner et al., 2019)	При рождении: <i>NUP93</i> , <i>CCSER1</i> , <i>MMRN1</i> , <i>SNCA</i> , <i>GPRIN3</i> , <i>HDGFL1</i> , <i>RF00026</i> , <i>DOK6</i> , <i>RF00001</i> , <i>CCDC102B</i> , <i>TMX3</i> , <i>DSEL</i> , <i>bta-mir-138-2</i> , <i>bta-mir-2284c</i> При первой лактации: <i>PTPRD</i> , <i>CYTL1</i> , <i>MSX1</i> , <i>STX18</i> , <i>NSG1</i> , <i>ACOX3</i> , <i>TRMT44</i> , <i>CPZ</i> , <i>HMX1</i>
<i>Passer domesticus</i> (домовый воробей)	ПГАА / клетки крови птенцов в возрасте 5–14 дней / (Pepke et al., 2021)	<i>FRMD4B</i> , <i>LMO3</i> , <i>ARL6IP5</i> , <i>UBA3</i> , <i>TMF1</i> , <i>EOGT</i> , <i>AQP1</i> , <i>GHRHR</i> , <i>OXR1</i> , <i>ORAI1</i> , <i>MORN3</i> , <i>KDM2B</i> , <i>RNF34</i> , <i>TMEM120B</i> , <i>RHOF</i> , <i>ANAPC5</i> , <i>SHCBP1</i> , <i>CDCA4</i> , <i>SCN4A</i> , <i>GH</i> , <i>GOSR2</i> , <i>WNT9B</i>
<i>Caenorhabditis elegans</i> (почвенная нематода)	ПГАА с использованием данных полногеномного секвенирования / клетки целых нематод / (Cook et al., 2016)	<i>pot-2</i> (<i>POT1</i>)*, <i>mms-19</i> (<i>MMS19</i>), <i>ZK1127.4</i> (<i>BCCIP</i>), <i>ZC487.2</i> , <i>srD-35</i> , <i>T06D8.3</i> (<i>PLPPR1</i> , <i>PLPPR5</i>), <i>ZK783.5</i> , <i>F58F6.3</i> , <i>C12D5.10</i>

* Для генов вида *C. elegans* в скобках приведены названия ортологических генов человека.

В исследовании на *C. elegans* (Cook et al., 2016) было найдено 9 генов-кандидатов (см. таблицу и Приложение 11). Один из девяти генов, *pot-2*, является ортологом гена *POT1* человека, кодирующего компонент шелтеринового комплекса. Авторы предполагают, что другой ген, *ZK1127.4*, тоже может быть вовлечен в регуляцию длины теломер, поскольку белок BCCIP, кодируемый геном-ортологом человека, взаимодействует с белком BRCA2, участвующим в репликации ДНК.

В целом при сопоставлении наборов генов-кандидатов, идентифицированных у человека и других трех видов животных, ортологичные гены почти не выявляются, что может быть связано как с видовыми особенностями регуляции длины теломер, так и с особенностями регуляции на разных этапах онтогенеза, а также принадлежностью образцов ДНК различным тканям и особям различного пола.

Заключение

В настоящей работе представлена компиляция генов, ассоциированных с длиной теломер по данным ПГАА, которая включает сведения о 270 генах человека (см. Приложение 3), а также о 23, 22 и 9 генах, выявленных у КРС, домового воробья и нематоды (см. таблицу). Рассмотрение функций 52 генов человека, для которых имелась функциональная интерпретация (см. рис. 4, Приложение 4), показало, что на длину теломер могут влиять варианты генов, кодирующих: 1) структурные компоненты теломеразы; 2) белковые компоненты теломерных участков хромосом (шелтериновый комплекс и CST комплекс); 3) белки, участвующие в биогенезе теломеразы и регулирующие ее активность; 4) белки, регулирующие функциональную активность белков шелтеринового комплекса; 5) белки, участвующие в репликации и/или кэпировании теломер; 6) белки, контролирующие альтернативный путь удлинения теломер; 7) белки, реагирующие на повреждение ДНК и отвечающие за репарацию; 8) компоненты РНК экзосом.

Выявлены гены-кандидаты человека, идентифицированные несколькими исследовательскими группами в популяциях различного этнического происхождения: гены, кодирующие компоненты теломеразы (*TERC* и *TERT*), а также ген *STN1*, кодирующий белок CST комплекса (см. рис. 5). По-видимому, полиморфные локусы, затрагивающие функции этих генов, могут быть наиболее надежными маркерами предрасположенности к заболеваниям, связанным с длиной теломер.

Сопоставление данных, полученных в результате ПГАА у человека (см. Приложение 3), с результатами подобных экспериментов, полученными для других видов животных (см. таблицу, Приложения 9–11), подтвердило и расширило представление о сложном полигенном характере регуляции длины теломер. При этом выявлена пара ортологичных генов, кодирующих белок шелтеринового комплекса (*POT1* у человека и *pot-2* у *C. elegans*), что демонстрирует важную биологическую значимость этого гена у разных видов организмов.

Систематизированные нами данные о генах и их функциях могут послужить основой при разработке прогностических критериев патологий человека, для которых показана четкая связь с длиной теломер. Кроме

того, сведения о биологических процессах, влияющих на длину теломер, и генах, контролирующих эти процессы, могут быть использованы для маркер-ориентированной и геномной селекции сельскохозяйственных животных, направленной на повышение продолжительности их хозяйственного использования.

Список литературы / References

- Aviv A., Shay J.W. Reflections on telomere dynamics and ageing-related diseases in humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2018;373(1741):20160436. DOI 10.1098/rstb.2016.0436.
- Bichet C., Bouwhuis S., Bauch C., Verhulst S., Becker P.H., Vedder O. Telomere length is repeatable, shortens with age and reproductive success, and predicts remaining lifespan in a long-lived seabird. *Mol. Ecol.* 2020;29(2):429–441. DOI 10.1111/mec.15331.
- Bizarro J., Bhardwaj A., Smith S., Meier U.T. Nopp140-mediated concentration of telomerase in Cajal bodies regulates telomere length. *Mol. Biol. Cell.* 2019;30(26):3136–3150. DOI 10.1091/mbc.E19-08-0429.
- Chen L., Roake C.M., Galati A., Bavasso F., Micheli E., Saggio I., Schoeftner S., Cacchione S., Gatti M., Artandi S.E., Raffa G.D. Loss of human TGS1 hypermethylase promotes increased telomerase RNA and telomere elongation. *Cell Rep.* 2020;30(5):1358–1372.e5. DOI 10.1016/j.celrep.2020.01.004.
- Chen L.Y., Redon S., Lingner J. The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature.* 2012;488(7412):540–544. DOI 10.1038/nature11269.
- Chik H.Y.J., Sparks A.M., Schroeder J., Dugdale H.L. A meta-analysis on the heritability of vertebrate telomere length. *J. Evol. Biol.* 2022;35(10):1283–1295. DOI 10.1111/jeb.14071.
- Claussnitzer M., Dankel S.N., Kim K.-H., Quon G., Meuleman W., Haugen C., Glunk V., Sousa I.S., Beaudry J.L., Puviindran V., Abdennur N.A., Liu J., Svensson P.-A., Hsu Y.-H., Drucker D.J., Mellgren G., Hui C.-Ch., Hauner H., Kellis M. FTO obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373:895–907. DOI 10.1056/NEJMoa1502214.
- Codd V., Nelson C.P., Albrecht E., Mangino M., Deelen J., Buxton J.L., Hottenga J.J., Fischer K., Esko T., Surakka I., ... Boomsma D.I., Jarvelin M.R., Slagboom P.E., Thompson J.R., Spector T.D., van der Harst P., Samani N.J. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat. Genet.* 2013; 45(4):422–427. DOI 10.1038/ng.2528.
- Codd V., Wang Q., Allara E., Musicha C., Kaptoge S., Stoma S., Jiang T., Hamby S.E., Braund P.S., Bountziouka V., Budgeon C.A., Denniff M., Swinfield C., Papakonstantinou M., Sheth S., Nanus D.E., Warner S.C., Wang M., Khera A.V., Eales J., Ouwehand W.H., Thompson J.R., Di Angelantonio E., Wood A.M., Butterworth A.S., Danesh J.N., Nelson C.P., Samani N.J. Polygenic basis and biomedical consequences of telomere length variation. *Nat. Genet.* 2021;53(10):1425–1433. DOI 10.1038/s41588-021-00944-6.
- Cook D.E., Zdravljjevic S., Tanny R.E., Seo B., Riccardi D.D., Noble L.M., Rockman M.V., Alkema M.J., Braendle C., Kammenga J.E., Wang J., Kruglyak L., Félix M.A., Lee J., Andersen E.C. The genetic basis of natural variation in *Caenorhabditis elegans* telomere length. *Genetics.* 2016;204(1):371–383. DOI 10.1534/genetics.116.191148.
- Crocco P., De Rango F., Dato S., Rose G., Passarino G. Telomere length as a function of age at population level parallels human survival curves. *Aging (Albany NY).* 2021;13(1):204–218. DOI 10.18632/aging.202498.
- de Lange T. Shelterin-mediated telomere protection. *Annu. Rev. Genet.* 2018;52:223–247. DOI 10.1146/annurev-genet-032918-021921.
- Diotti R., Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus.* 2011;2(2):119–135. DOI 10.4161/nucl.2.2.15135.
- Dorajoo R., Chang X., Gurung R.L., Li Z., Wang L., Wang R., Beckman K.B., Adams-Haduch J., M Y., Liu S., Meah W.Y., Sim K.S.,

- Lim S.C., Friedlander Y., Liu J., van Dam R.M., Yuan J.M., Koh W.P., Khor C.C., Heng C.K. Loci for human leukocyte telomere length in the Singaporean Chinese population and trans-ethnic genetic studies. *Nat. Commun.* 2019;10(1):2491. DOI 10.1038/s41467-019-10443-2.
- Egan E.D., Collins K. Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. *RNA*. 2012;18(10):1747-1759. DOI 10.1261/rna.034629.112.
- Fan H.C., Chang F.W., Tsai J.D., Lin K.M., Chen C.M., Lin S.Z., Liu C.A., Harn H.J. Telomeres and cancer. *Life (Basel)*. 2021;11(12):1405. DOI 10.3390/life11121405.
- Ilska-Warner J.J., Psifidi A., Seeker L.A., Wilbourn R.V., Underwood S.L., Fairlie J., Whitelaw B., Nussey D.H., Coffey M.P., Banos G. The genetic architecture of bovine telomere length in early life and association with animal fitness. *Front. Genet.* 2019;10:1048. DOI 10.3389/fgene.2019.01048.
- Jafri M.A., Ansari S.A., Alqahtani M.H., Shay J.W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 2016;8(1):69. DOI 10.1186/s13073-016-0324-x.
- Joyce B.T., Zheng Y., Nannini D., Zhang Z., Liu L., Gao T., Kocherginsky M., Murphy R., Yang H., Achenbach C.J., Roberts L.R., Hoxha M., Shen J., Vokonas P., Schwartz J., Baccarelli A., Hou L. DNA methylation of telomere-related genes and cancer risk. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 2018;11(8):511-522. DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0413.
- Kong C.M., Lee X.W., Wang X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS J.* 2013;280(14):3180-3193. DOI 10.1111/febs.12326.
- Kroustallaki P., Lirussi L., Carracedo S., You P., Esbensen Q.Y., Götz A., Jobert L., Alsøe L., Sætrom P., Gagos S., Nilsen H. SMUG1 promotes telomere maintenance through telomerase RNA processing. *Cell Rep.* 2019;28(7):1690-1702.e10. DOI 10.1016/j.celrep.2019.07.040.
- Li C., Stoma S., Lotta L.A., Warner S., Albrecht E., Allione A., Arp P.P., Broer L., Buxton J.L., Da Silva Couto Alves A., ... Butterworth A.S., Danesh J., Samani N.J., Wareham N.J., Nelson C.P., Langenberg C., Codd V. Genome-wide association analysis in humans links nucleotide metabolism to leukocyte telomere length. *Am. J. Hum. Genet.* 2020;106(3):389-404. DOI 10.1016/j.ajhg.2020.02.006.
- Mangino M., Christiansen L., Stone R., Hunt S.C., Horvath K., Eisenberg D.T., Kimura M., Petersen I., Kark J.D., Herbig U., Reiner A.P., Benetos A., Codd V., Nyholt D.R., Sinnreich R., Christensen K., Nassar H., Hwang S.J., Levy D., Bataille V., Fitzpatrick A.L., Chen W., Berenson G.S., Samani N.J., Martin N.G., Tishkoff S., Schork N.J., Kyvik K.O., Dalgård C., Spector T.D., Aviv A. *DCAF4*, a novel gene associated with leukocyte telomere length. *J. Med. Genet.* 2015;52(3):157-162. DOI 10.1136/jmedgenet-2014-102681.
- Mangino M., Richards J.B., Soranzo N., Zhai G., Aviv A., Valdes A.M., Samani N.J., Deloukas P., Spector T.D. A genome-wide association study identifies a novel locus on chromosome 18q12.2 influencing white cell telomere length. *J. Med. Genet.* 2009;46(7):451-454. DOI 10.1136/jmg.2008.064956.
- Monaghan P., Ozanne S.E. Somatic growth and telomere dynamics in vertebrates: relationships, mechanisms and consequences. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2018;373(1741):20160446. DOI 10.1098/rstb.2016.0446.
- Nagpal N., Wang J., Zeng J., Lo E., Moon D.H., Luk K., Braun R.O., Burroughs L.M., Keel S.B., Reilly C., Lindsley R.C., Wolfe S.A., Tai A.K., Cahan P., Bauer D.E., Fong Y.W., Agarwal S. Small-molecule PAPD5 inhibitors restore telomerase activity in patient stem cells. *Cell Stem Cell.* 2020;26(6):896-909.e8. DOI 10.1016/j.stem.2020.03.016.
- Nersisyan L., Nikoghosyan M., Genome of the Netherlands consortium, Arakelyan A. WGS-based telomere length analysis in Dutch family trios implicates stronger maternal inheritance and a role for *RRM1* gene. *Sci. Rep.* 2019;9(1):18758. DOI 10.1038/s41598-019-55109-7.
- Oh W., Ghim J., Lee E.W., Yang M.R., Kim E.T., Ahn J.H., Song J. PML-IV functions as a negative regulator of telomerase by interacting with TERT. *J. Cell Sci.* 2009;122(Pt.15):2613-2622. DOI 10.1242/jcs.048066.
- Ohira T., Kojima H., Kuroda Y., Aoki S., Inaoka D., Osaki M., Wanibuchi H., Okada F., Oshimura M., Kugoh H. PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription. *PLoS One*. 2019;14(8):e0217605. DOI 10.1371/journal.pone.0217605.
- Pepke M.L., Kvalnes T., Lundregan S., Boner W., Monaghan P., Sæther B.E., Jensen H., Ringsby T.H. Genetic architecture and heritability of early-life telomere length in a wild passerine. *Mol. Ecol.* 2021. DOI 10.1111/mec.16288.
- Podlevsky J.D., Bley C.J., Omana R.V., Qi X., Chen J.J. The telomerase database. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D339-D343. DOI 10.1093/nar/gkm700.
- Potts P.R., Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14(7):581-590. DOI 10.1038/nsmb1259.
- Saxena R., Bjorntjes A., Prescott J., Dib P., Natt P., Lane J., Lerner M., Cooper J.A., Ye Y., Li K.W., Maubaret C.G., Codd V., Brackett D., Mirabello L., Kraft P., Dinney C.P., Stowell D., Peyton M., Ralhan S., Wander G.S., Mehra N.K., Salpea K.D., Gu J., Wu X., Mangino M., Hunter D.J., De Vivo I., Humphries S.E., Samani N.J., Spector T.D., Savage S.A., Sanghera D.K. Genome-wide association study identifies variants in casein kinase II (*CSNK2A2*) to be associated with leukocyte telomere length in a Punjabi Sikh diabetic cohort. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2014;7(3):287-295. DOI 10.1161/CIRCGENETICS.113.000412.
- Schrumpfová P.P., Fajkus J. Composition and function of telomerase-A polymerase associated with the origin of eukaryotes. *Biomolecules*. 2020;10(10):1425. DOI 10.3390/biom10101425.
- Seeker L.A., Underwood S.L., Wilbourn R.V., Dorrens J., Froy H., Holland R., Ilska J.J., Psifidi A., Bagnall A., Whitelaw B., Coffey M., Banos G., Nussey D.H. Telomere attrition rates are associated with weather conditions and predict productive lifespan in dairy cattle. *Sci. Rep.* 2021;11(1):5589. DOI 10.1038/s41598-021-84984-2.
- Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W216-221. DOI 10.1093/nar/gkac194.
- Snow B.E., Erdmann N., Cruickshank J., Goldman H., Gill R.M., Robinson M.O., Harrington L. Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr. Biol.* 2003;13(8):698-704. DOI 10.1016/s0960-9822(03)00210-0.
- Sobinoff A.P., Pickett H.A. Alternative lengthening of telomeres: DNA repair pathways converge. *Trends Genet.* 2017;33(12):921-932. DOI 10.1016/j.tig.2017.09.003.
- Sobinoff A.P., Pickett H.A. Mechanisms that drive telomere maintenance and recombination in human cancers. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2020;60:25-30. DOI 10.1016/j.gde.2020.02.006.
- Stuparević I., Novačić A., Rahmouni A.R., Fernandez A., Lamb N., Primig M. Regulation of the conserved 3'-5' exoribonuclease EXOSC10/Rp6 during cell division, development and cancer. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2021;96(4):1092-1113. DOI 10.1111/brv.12693.
- Tennen R.I., Bua D.J., Wright W.E., Chua K.F. SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. *Nat. Commun.* 2011;2:433. DOI 10.1038/ncomms1443.
- Tseng C.K., Wang H.F., Burns A.M., Schroeder M.R., Gaspari M., Baumann P. Human telomerase RNA processing and quality control. *Cell Rep.* 2015;13(10):2232-2243. DOI 10.1016/j.celrep.2015.10.075.
- Tutton S., Azzam G.A., Stong N., Vladimirova O., Wiedmer A., Monteith J.A., Beishline K., Wang Z., Deng Z., Riethman H., McMahon S.B., Murphy M., Lieberman P.M. Subtelomeric p53 bind-

- ing prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. *EMBO J.* 2016;35(2):193-207. DOI 10.15252/embj.201490880.
- Van de Vosse D.W., Wan Y., Lapetina D.L., Chen W.M., Chiang J.H., Aitchison J.D., Wozniak R.W. A role for the nucleoporin Nup170p in chromatin structure and gene silencing. *Cell.* 2013;152(5):969-983. DOI 10.1016/j.cell.2013.01.049.
- Vera E., Bernardes de Jesus B., Foronda M., Flores J.M., Blasco M.A. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep.* 2012;2(4):732-737. DOI 10.1016/j.celrep.2012.08.023.
- Wilbourn R.V., Moatt J.P., Froy H., Walling C.A., Nussey D.H., Boonekamp J.J. The relationship between telomere length and mortality risk in non-model vertebrate systems: a meta-analysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2018;373(1741):20160447. DOI 10.1098/rstb.2016.0447.
- Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E., Byrd W., Shay J.W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 1996;18(2):173-179. DOI 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3.
- Zeiger A.M., White M.J., Eng C., Oh S.S., Witonsky J., Goddard P.C., Contreras M.G., Elhawary J.R., Hu D., Mak A.C.Y., Lee E.Y., Keys K.L., Samedy L.A., Risse-Adams O., Magaña J., Huntsman S., Salazar S., Davis A., Meade K., Brigino-Buenaventura E., LeNoir M.A., Farber H.J., Bibbins-Domingo K., Borrell L.N., Burchard E.G. Genetic determinants of telomere length in African American youth. *Sci. Rep.* 2018;8(1):13265. DOI 10.1038/s41598-018-31238-3.

ORCID ID

E.V. Ignatieva orcid.org/0000-0002-8588-6511

N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554

D.M. Larkin orcid.org/0000-0001-7859-6201

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00143, <https://rscf.ru/project/22-26-00143/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.11.2022. После доработки 04.12.2022. Принята к публикации 05.12.2022.

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, ВИНИТИ, 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:
русскоязычная версия – на сайте ИЦиГ СО РАН, <https://sites.icgbio.ru/vogis/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

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 24.05.2023. Выход в свет 31.05.2023. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 12.55.

Уч.-изд. л. 15.2. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–45 экз.) Заказ № 106. Цена свободная.

Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

