

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

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

Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually***Founders**

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

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Executive Secretary

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

Editorial council

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

Editorial board

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

379

ОТ РЕДАКТОРА

Молекулярная и клеточная биология

380

ОБЗОР

Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова

390

ОБЗОР

Регуляторная роль цистатина С в аутофагии и нейродегенерации. Т.А. Короленко, А.Б. Шинтяпина, А.Б. Пупышев, А.А. Аюпова, Г.С. Русских, М.А. Диковская, В.А. Вавилин, Е.Л. Завьялов, М.А. Тихонова, Т.Г. Амстиславская (на англ. языке)

398

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Изучение иммуногенности рекомбинантного фрагмента ортопоксвирусного белка р35. Я.А. Хлусевич, А.Л. Матвеев, Е.П. Гончарова, И.К. Байков, Н.В. Тикунова

Генетика растений

405

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения. А.В. Щенникова, А.М. Камионская, А.В. Нежданова, К.С. Гаврилова, М.А. Филюшин, Е.З. Кочиева, К.Г. Скрыбин

412

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Спорофитный тип восстановления фертильности в ЦМС-индуцирующей цитоплазме сорго типа А₃ и его модификация условиями влагообеспеченности растений. Л.А. Эльконин, В.В. Кожемякин, М.И. Цветова

Генофонд и селекция растений

422

МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ

Модифицированный метод дроблети-вирификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. Т.А. Гавриленко, Н.А. Швачко, Н.Н. Волкова, Ю.В. Ухатова

430

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Использование метода путевых коэффициентов S. Wright для статистического анализа системы взаимосвязанных признаков риса. Д.П. Паламарчук, М.Р. Козаченко, С.И. Святченко

439

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Факторы, влияющие на репродуктивную способность инбредных растений свеклы столовой при создании линейного материала для селекции. М.И. Федорова, Е.Г. Козарь, С.А. Ветрова, В.А. Заячковский, В.А. Степанов

Физиологическая генетика

448

ОБЗОР

Генетические подходы к изучению функций серотонинергических нейронов у животных. У.С. Дрозд, Е.В. Шабурова, Н.Н. Дыгало

456

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние неонатального введения дексаметазона на когнитивные способности взрослых самцов мышей и экспрессию генов в гипоталамусе. Н.П. Бондарь, В.В. Решетников, К.В. Бурдеева, Т.И. Меркулова

Генетика человека

465

ОБЗОР

Генетические основы предрасположенности к депрессивным расстройствам. Ю.Д. Давыдова, Р.Ф. Еникеева, А.В. Казанцева, Р.Н. Мустафин, А.Р. Романова, С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова

473

ОБЗОР

Популяционная генетика полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксий. А.Н. Шуваев, О.С. Белозор, М.В. Смольникова, Д.А. Яковлева, Андр.Н. Шуваев, О.М. Казанцева, Е.А. Пожиленкова, О.И. Можей, С. Каспаров (на англ. языке)

Генетика животных

482

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Роль ольфакторного транспорта в проникновении наночастиц оксида марганца из кровеносного русла в мозг. А.В. Ромащенко, М.Б. Шарапова, К.Н. Морозова, Е.В. Киселева, К.Э. Купер, Д.В. Петровский

489

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров. К.С. Пантюх, И.В. Рукин, С.М. Портнов, А. Хатиб, С.Л. Пантелеев, А.М. Мазур

Экологическая и популяционная генетика

496

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сопряженность двух видов фенотипической изменчивости липы мелколистной. С.Г. Баранов, И.Е. Зыков, Д.Д. Кузнецова

379 FROM THE EDITOR

Molecular and cell biology

- 380 REVIEW
The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress. *R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova*

- 390 REVIEW
The regulatory role of cystatin C in autophagy and neurodegeneration. *T.A. Korolenko, A.B. Shintyapina, A.B. Pupyshchev, A.A. Akopyan, G.S. Russkikh, M.A. Dikovskaya, V.A. Vavilin, E.L. Zavjalov, M.A. Tikhonova, T.G. Amstislavskaya*

- 398 ORIGINAL ARTICLE
Immunogenicity of recombinant fragment of orthopoxvirus p35 protein in mice. *Ya.A. Khlusevich, A.L. Matveev, E.P. Goncharova, I.K. Baykov, N.V. Tikunova*

Plant genetics

- 405 ORIGINAL ARTICLE
Transcription factors MhyFIL1 and MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) determine the asymmetric development of above-ground lateral organs in plants. *A.V. Shchennikova, A.M. Kamionskaya, A.V. Nezhdanova, K.S. Gavrilova, M.A. Filyushin, E.Z. Kochieva, K.G. Skryabin*

- 412 ORIGINAL ARTICLE
The sporophytic type of fertility restoration in the A₃ CMS-inducing cytoplasm of sorghum and its modification by plant water availability conditions. *L.A. Elkonin, V.V. Kozhemyakin, M.I. Tsvetova*

Plant gene pool and breeding

- 422 METHODS AND PROTOCOLS
A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from *in vitro* potato plants. *T.A. Gavrilenko, N.A. Shvachko, N.N. Volkova, Yu.V. Ukhato*

- 430 ORIGINAL ARTICLE
Use of S. Wright's path coefficient method for statistical analysis of interrelated traits in rice. *D.P. Palamarchuk, M.R. Kozachenko, S.I. Sviatchenko*

- 439 ORIGINAL ARTICLE
Factors to affect inbred beet plants while developing material for linear selection. *M.I. Fedorova, E.G. Kozar, S.A. Vetrova, V.A. Zayachkovskiy, V.A. Stepanov*

Physiological genetics

- 448 REVIEW
Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals. *U.S. Drozd, E.V. Shaburova, N.N. Dygalo*

- 456 ORIGINAL ARTICLE
Effect of neonatal dexamethasone treatment on cognitive abilities of adult male mice and gene expression in the hypothalamus. *N.P. Bondar, V.V. Reshetnikov, K.V. Burdeeva, T.I. Merkulova*

Human genetics

- 465 REVIEW
Genetic basis of depressive disorders. *Yu.D. Davydova, R.F. Enikeeva, A.V. Kazantseva, R.N. Mustafin, A.R. Romanova, S.B. Malykh, E.K. Khusnutdinova*

- 473 REVIEW
Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions. *A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, M.V. Smolnikova, D.A. Yakovleva, Andr.N. Shuvaev, O.M. Kazantseva, E.A. Pozhilenkova, O.I. Mozhei, S. Kasparov*

Animal genetics

- 482 ORIGINAL ARTICLE
The role of olfactory transport in the penetration of manganese oxide nanoparticles from blood into the brain. *A.V. Romashchenko, M.B. Sharapova, K.N. Morozova, E.V. Kiseleva, K.E. Kuper, D.V. Petrovskii*

- 489 ORIGINAL ARTICLE
The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos. *K.S. Pantiukh, I.V. Rukin, S.M. Portnov, A. Khatib, S.L. Panteleev, A.M. Mazur*

Ecological and population genetics

- 496 ORIGINAL ARTICLE
Conjugacy of two types of phenotypic variability of small-leaved linden. *S.G. Baranov, I.E. Zykov, D.D. Kuznetsova*

Уважаемые коллеги, дорогие читатели! Предлагаем Вашему вниманию летний выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции», посвященный ряду актуальных направлений в области генетики растений, животных и человека, молекулярной и популяционной генетики и клеточной биологии.

Раздел «Молекулярная и клеточная биология» состоит из двух обзорных статей и экспериментального исследования. Открывает рубрику обзор, в котором изложены современные представления о роли мобильных элементов в процессах морфогенеза у растений и животных. Роль цистатина С и его терапевтическая функция в лечении нейродегенеративных заболеваний (болезней Альцгеймера и Паркинсона) рассмотрены в следующем обзоре. В экспериментальном исследовании раздела представлены результаты использования рекомбинантных белков для профилактики и лечения инфекций, вызванных ортопоксвирусами.

Разделы «Генетика растений» и «Генофонд и селекция растений» включают пять оригинальных исследований. Рассматриваемый в них спектр проблем достаточно широк: от влияния «вегетативных» генов *YABBY*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3* и их гомологов на асимметрию листа у высших растений до биоинформатических подходов для оценки признаков продуктивности у сельскохозяйственных культур. В одной из экспериментальных статей предложены методические рекомендации по криоконсервации апексов растений культурных видов картофеля с пошаговым протоколом. Привлекает также внимание работа, в которой обсуждаются проблемы цитоплазматической мужской стерильности у сорго и механизмы восстановления фертильности.

Рубрика «Физиологическая генетика» представлена обзорной статьей и оригинальным исследованием.

В обзоре литературных данных освещены вопросы патогенеза психических и нейродегенеративных заболеваний. Рассмотрены модели патологических состояний с участием серотонинергической системы, описаны генетические подходы по разработке фармакологических средств для коррекции болезней. В задачу экспериментальной работы раздела входило изучение влияния неонатального введения синтетического глюкокортикоидного гормона дексаметазона на когнитивные способности животных.

Два литературных обзора вошли в рубрику «Генетика человека». В одном из них обсуждаются результаты исследования депрессивных расстройств, полученные с помощью современных полногеномных и полноэкзомных подходов. Описаны ключевые процессы, принимающие участие в формировании депрессии, в том числе эпигенетические факторы. Второй обзор знакомит с молекулярными механизмами наследственных спиноцеребральных атаксий, входящих в число нейрогенеративных заболеваний, которые приводят к нарушению координации движений.

Проведение генетического мониторинга очень важно для выявления моногенных заболеваний у крупного рогатого скота. Предлагаем вниманию читателя оригинальное исследование по применению полногеномного поиска ассоциаций для выявления летальных гаплотипов у эмбрионов коров голштинской или черно-пестрой голштинизированной породной группы. Еще одна статья посвящена генетическому мониторингу жизнеспособных эмбрионов животных с целью создания системы ускоренного воспроизводства высокоценного племенного скота. Результаты представлены в разделе «Генетика животных».

Завершает журнал рубрика «Экологическая и популяционная генетика», в которой приведены экспериментальные данные по изучению фенотипической изменчивости листовой пластины липы мелколистной. Получены корреляции между вариациями признаков листа и условиями произрастания в городской среде и сельской местности.

Мы рады сообщить нашим читателям, что журнал вошел в третий (категория Agricultural and Biological Sciences) и четвертый (категория Biochemistry, Genetics and Molecular Biology) квартили базы данных Scopus (см. <https://www.scopus.com/sourceid/21100822819?origin=resultlist#tabs=1>).

Академик В.К. Шумный

Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе

Р.Н. Мустафин¹✉, Э.К. Хуснутдинова^{1, 2}✉

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

✉ e-mail: ruji79@mail.ru; elzakh@mail.ru

Инсерционный мутагенез, обусловленный транспозициями мобильных элементов, лежит в основе изменений геномов в естественном отборе. Транспозоны являются сенсором экологических стрессовых воздействий, благодаря чему воздействия стрессоров на организмы потенцируют изменения расположения транспозонов, что способствует адаптации и видообразованию. Это обусловлено изменением механизмов морфогенеза, так как транспозоны содержат в своем составе регуляторные последовательности, оказывающие *cis*- и *trans*-воздействие на экспрессию специфических белок-кодирующих генов. Мобильные генетические элементы способны также к сайт-специфическим перемещениям, которые приводят к активации генов стрессового ответа. Кроме того, транспозоны служат источниками микроРНК, siРНК, длинных некодирующих РНК и сайтов связывания с транскрипционными факторами. В эволюции благодаря мобильным генетическим элементам возникают новые белок-кодирующие гены путем одомашнивания, экзонизации и дупликации. Данные гены содержат нуклеотидные последовательности, которые взаимодействуют с процессированными из транспозонных транскриптов некодирующими РНК, в связи с чем они находятся под управлением эпигенетических регуляторных сетей с участием мобильных генетических элементов. Поэтому наследуемые особенности расположения и состава транспозонов могут иметь значение в характере реагирования на определенные экологические стрессорные воздействия. Это служит основой для отбора и выживания особей со специфическим составом и характером расположения транспозонов, способствующих адаптации при определенных средовых условиях. В эволюции свойство транспозонов перемещаться в специфические сайты генома, регулировать экспрессию генов и взаимодействовать с транскрипционными факторами, наряду со способностью реагировать на экологические стрессоры, является основой для быстрой изменчивости и видообразования за счет модулирования управления онтогенезом. Роль транспозонов в экологическом морфогенезе подтверждена данными об их ткане- и стадийспецифических особенностях активации и участии в управлении дифференцировкой клеток в эмбриогенезе и постнатальном развитии. Дополнительным источником изменчивости служит горизонтальный перенос транспозонов, способствующий изменению их состава в геномах.

Ключевые слова: изменчивость; морфогенез; стресс; транспозоны; эволюция.

Для цитирования: Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506

The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress

R.N. Mustafin¹✉, E.K. Khusnutdinova^{1, 2}✉

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of RAS, Ufa, Russia

✉ e-mail: ruji79@mail.ru; elzakh@mail.ru

In natural selection, insertional mutagenesis is an important source of genome variability. Transposons are sensors of environmental stress effects, which contributes to adaptation and speciation. These effects are due to changes in the mechanisms of morphogenesis, since transposons contain regulatory sequences that have *cis* and *trans* effects on specific protein-coding genes. In variability of genomes, the horizontal transfer of transposons plays an important role, because it contributes to changing the composition of transposons and the acquisition of new properties. Transposons are capable of site-specific transpositions, which lead to the activation of stress response genes. Transposons are sources of non-coding RNA, transcription factors binding sites and protein-coding genes due to domestication, exonization, and duplication. These genes contain nucleotide sequences that interact with non-coding RNAs processed from transposons transcripts, and therefore they are under the control of epigenetic regulatory networks involving transposons. Therefore, inherited features of the location and composition of transposons, along with a change in the phenotype, play an important role in the characteristics of responding to a

variety of environmental stressors. This is the basis for the selection and survival of organisms with a specific composition and arrangement of transposons that contribute to adaptation under certain environmental conditions. In evolution, the capability to transpose into specific genome sites, regulate gene expression, and interact with transcription factors, along with the ability to respond to stressors, is the basis for rapid variability and speciation by altering the regulation of ontogenesis. The review presents evidence of tissue-specific and stage-specific features of transposon activation and their role in the regulation of cell differentiation to confirm their role in ecological morphogenesis.

Key words: variability; morphogenesis; stress; transposable elements; evolution.

For citation: Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506 (in Russian)

Введение

Экологический морфогенез отражает особенности роста и развития организмов под влиянием ключевых механизмов адаптации при воздействии экологических факторов (Curran, 2015). Основные принципы экологического морфогенеза связаны с тем, что генетические программы, контролирующие дифференцировку и развитие тканей, эволюционировали под действием определенных факторов окружающей среды с отбором оптимальных адаптивных морфофункциональных возможностей организма (Deng et al., 2014). Еще в 1940-х гг. К. Уоддингтоном (Waddington, 1942) было выявлено, что некоторые фенотипические черты, индуцированные методом теплового шока у куколок дрозофилы и затем отобранные в ряду поколений, при наличии теплового шока становятся наследуемыми. То есть вызванные экологическими стрессорами (ЭС) изменения фенотипических признаков могут наследоваться через зародышевую линию. Для дарвиновского объяснения полученных данных Уоддингтон разработал концепцию «канализации и ассимиляции». Канализацией была названа устойчивость организма к стрессу и способность поддерживать постоянство фенотипа. При этом генетические вариации генов организмов одного вида, способные изменить фенотип, остаются скрытыми. Если стресс достаточно сильный, чтобы преодолеть эту устойчивость, путь развития может измениться благодаря экспрессии определенного гена из имеющихся вариаций, которые оставались скрытыми. Этот вариант может сохраниться в ходе отбора и стать наследуемым посредством процесса ассимиляции (Waddington, 1959).

В литературе накоплены данные, позволяющие предположить, что скрытыми генетическими структурами, которые способны изменять экспрессию специфических генов в ответ на определенные ЭС, преодолевающие устойчивость к постоянству фенотипа, могут быть транспозоны, так как они играют важную роль в регуляции экспрессии генов в онтогенезе (de Souza et al., 2013; Pavlicev et al., 2015; Wang et al., 2016; Ito et al., 2017; Ramsay et al., 2017; Saze, 2018) и служат источниками изменений эпигенетических (ЭГ) факторов (Li et al., 2011; Ito, 2012; Kapusta et al., 2013; Gim et al., 2014; Cho, 2018).

Транспозоны (ТЕ – transposable elements) – это генетические элементы, перемещающиеся из одной позиции в геноме в другую. Они могут быть простыми (например, инсерционные элементы – IS) или сложными, несущими гены, которые участвуют в конъюгации и лекарственной устойчивости у прокариот. Размеры ТЕ варьируют от 0.7 до 500 тыс. пар нуклеотидов (Zhang, Saier, 2012). Номен-

клатурная система IS-элементов прокариот представлена в базе данных (<http://www-IS.biotoul.fr>). Для классификации транспозонов бактерий и архей используют систему, предложенную в 2008 г. (Roberts et al., 2008). Различают два основных класса ТЕ. Класс I представлен ретроэлементами (РЭ), которые перемещаются по механизму «копирование–вставка». Среди них выделяют LTR-РЭ, которые содержат длинные концевые повторы (long terminal repeat – LTR), включающие эндогенные ретровирусы (endogenous retroviruses – ERV), и non-LTR-РЭ (не содержащие LTR). Разные их представители содержат транскриптазу (reverse transcriptase – RT) для репликации, но различаются составом каталитических компонентов, ответственных за интеграцию в геном хозяина. В класс II входят ДНК-ТЕ, перемещающиеся путем «вырезания–вставки» или «катящегося кольца». Их транспозиция возможна благодаря трем различным механизмам: DDD/Е транспозаза, тирозиновой рекомбиназы и эндонуклеазы HUH в сочетании с геликазой (Kojima, 2018). Самая распространенная классификация ТЕ представлена в Repbase (<http://www.girinst.org/repbase/>). ТЕ составляют также значительную часть геномов растений (более 80 %), грибов (3–20 %) и животных (3–45 %) (Wicker et al., 2007).

Существенный вклад в изучение ТЕ, их систематизацию и определение регуляторной роли внесли отечественные исследователи. Еще в 1984 г. Р.Б. Хесин в своей монографии «Непостоянство генома» подробно описал и систематизировал ТЕ прокариот и эукариот, отметив их роль в генетической рекомбинации, приводящей к умножению генов. Параллельную изменчивость Хесин объяснял влиянием ТЕ со сходной сайт-специфичностью интеграции (Хесин, 1984). В дальнейших экспериментальных работах на дрозофиле была подтверждена роль сайт-специфической интеграции ТЕ как адаптирующей способности геномов (Кайданов и др., 1996). При расположении ТЕ вблизи определенных генов из-за особенностей герминативных инсерций определенной особи возможна специфическая реакция на ЭС, что объясняет понятия «канализации и ассимиляции» на генетическом уровне. Это обусловлено активацией ТЕ в ответ на воздействие стресса (Todeschini et al., 2005; Маркель, 2008; Ito et al., 2016) и влиянием ТЕ на чувствительные к стрессу гены вследствие содержания регуляторных нуклеотидных последовательностей в транспозонах (de Souza et al., 2013; Feng et al., 2013). Например, в геноме человека выявлено 794972 сайта связывания с транскрипционными факторами (ТФ), произошедших только от LTR-РЭ, которые характеризуются специфической активацией в разные стадии

развития и в зависимости от ткани (Ito et al., 2017). Кроме того, в ходе эволюции сформировалась способность ТЕ к сайт-специфической транспозиции (Маркель, 2008; Feng et al., 2013), обеспечивающей ТЕ, помимо динамического влияния на экспрессию белок-кодирующих генов (БКГ) *in cis* и *in trans* (de Souza et al., 2013; Sahebi et al., 2018), стабильное изменение регуляции генов за счет структурных перестроек. Изменчивость, индуцированная ЭС, лежит в основе эволюционных процессов (Маркель, 2008), а многие виды эукариот возникли при «вспышках транспозиций» при межвидовой гибридизации, действовавшей в качестве «геномного шока» (Чересиз и др., 2008).

Активация ТЕ под действием стресса впервые была описана Б. Мак-Клинтоком. В ее ранних наблюдениях показано, что транспозиции связаны с явлениями гетерохроматинизации, а мобилизация гетерохроматиновых доменов может изменять экспрессию генов. Мак-Клинток предполагала, что ТЕ, которые она называла контролирующими элементами, позволяют геному более гибко реагировать на стресс (McClintock, 1984). Действительно, ТЕ играют важную роль в адаптации. Инсерции ТЕ могут влиять на особенности экспрессии генов хозяина и обеспечивать организмы механизмами быстрой генетической изменчивости за счет реагирования ТЕ на стресс. Так, у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) перемещение активируемого нагреванием ТЕ *ONSEN* приводит к мутации гена, чувствительного к абсцизовой кислоте (АВА). Это способствует нечувствительности растения к АВА и толерантности к стрессору. То есть активация ТЕ под действием ЭС может вызывать модулирование реакции хозяина на воздействия среды. Эпигенетические механизмы обычно заглушают эффект новой инсерции (для АВА при помощи IBM2), но могут выборочно «включать» ТЕ при стрессе (Ito et al., 2016). Индукция интеграционных событий под влиянием ЭС выявлена у грибов. Например, у *Saccharomyces cerevisiae* ретрозлементы *Ty1* активируются под влиянием различных ЭС, в том числе при недостатке аденина (Todeschini et al., 2005).

Роль ТЕ в эволюционной изменчивости связана также с их способностью вызывать хромосомные перегруппировки, включая делеции, инверсии и слияние репликонов — центральные события многих эволюционных процессов. Кроме того, ТЕ являются причиной значительной реорганизации генов из первоначальных случайных порядков под давлением отбора. У эукариот в ходе эволюции ТЕ способствовали возникновению адаптивных мутаций, происходящих случайным образом, но с повышенной скоростью в условиях воздействия стресса (Zhang, Saier, 2012). Наблюдаемые в ответ на стресс широкомасштабные изменения метилирования ДНК (Downen et al., 2012) могут отражать динамику экспрессии ТЕ, чувствительных к ЭС и стрессовой реакции организма (Todeschini et al., 2005; Маркель, 2008; Ito et al., 2016). Это обусловлено важной ролью ТЕ в качестве источников возникновения некодирующих РНК (нкРНК) (Li et al., 2011; Gim et al., 2014; Cho, 2018), которые оказывают регуляторное влияние на структуру хроматина и метилирование генома (Ito, 2012; Zhang et al., 2015). Кроме того, свойство ТЕ при их активации усиливать транскрипцию генов стрессового ответа (Feng et al., 2013; Ito et al., 2016), а также оказывать регу-

ляторное воздействие *in cis* и *in trans* на разнообразные БКГ (de Souza et al., 2013) делает ТЕ универсальными посредниками взаимодействия генома с ЭС. Например, при исследовании ДНК-деметилаз у растений выявлено, что их первичная функция заключается в регуляции экспрессии генов стрессового ответа за счет влияния на промоторы ТЕ (Le et al., 2014). Влияние ТЕ на регуляцию работы генома связано также с тем, что в эволюции они оказались важнейшими источниками генов ТФ (Lin et al., 2007; Feschotte, 2008) и сайтов связывания с ними, активация которых характерна для переключения экспрессии генов при дифференцировке клеток в онтогенезе (de Souza et al., 2013; Ito et al., 2017).

Экспрессия ТЕ чувствительна как к ЭС, так и к стрессовым реакциям самого организма. При этом ТЕ могут вызывать локальную регуляцию определенных генов, действуя как энхансеры (Makarevitch et al., 2015), а также изменять экспрессию специфических генов с помощью нкРНК (Cho, 2018). ТЕ могут действовать как стресс-чувствительные регуляторы, влияя *in cis* и *in trans* на работу БКГ (de Souza et al., 2013; Sahebi et al., 2018). Геномы хозяев, в свою очередь, выработали в ходе эволюции способность регулировать активность и специфичность интеграции для ТЕ, смягчая нестабильность генома, вызванную неконтролируемыми транспозициями. В недавних исследованиях показана ключевая роль малых нкРНК в регуляции транспозиций у грибов, растений и животных через консервативный механизм. Сигналы о наличии РНК транспозонов или их интеграции в специфические локусы генома передаются малым нкРНК, которые направляют эпигенетические модификации и сайленсинг гена обратно к ТЕ (Wheeler, 2013). Регуляция ТЕ геномом хозяина носит глобальный характер с вовлечением всех разновидностей нкРНК (Мустафин, Хуснутдинова, 2017). Учитывая важную роль ТЕ в качестве источников нкРНК, можно предположить, что в ходе эволюции ТЕ выработали способность саморегуляции при помощи процессированных продуктов собственной транскрипции, обеспечивающей их оптимальное взаимодействие с геномом хозяина. ТЕ могут индуцировать мутации под контролем факторов хозяина в процессе, фенотипически и механистически соответствующем определению «направленные мутации», которые происходят с высокой частотой при воздействии стресса, если они выгодны хозяину. Прототипы направленных мутаций обнаружены у бактерий. Например, линии *E. coli* с делецией гена *crp* не могут расти на глицерине (Glp(–)). Однако инсерции IS5 в специфическую область непосредственно перед промотором *glpFK* приводят к эффективному использованию глицерина (Glp(+)) со скоростями, которые значительно увеличиваются присутствием глицерина или потерей репрессора глицерина (GlpR) (Zhang, Saier, 2012). Закономерные интеграции ТЕ выявлены в геноме *Schizosaccharomyces pombe*, в котором LTR-РЭ *Ty1* встраивается в промоторы с предпочтением генов стрессового ответа (Feng et al., 2013). Были выявлены также сайты предпочтительной интеграции ТЕ под действием стресса у *D. melanogaster* (Васильева и др., 1997). У данного объекта 94 % всех инсерций Р-элемента и все инсерции других элементов (*jockey*, *gypsy*) в области промоторов генов приходились на ген теплового

шока *hsp70* (Walser et al., 2006). То есть опосредованные транспозонами изменения являются «направленными мутациями» (Чересиз и др., 2008).

Активация транспозонов при стрессе у растений

Растения различаются составом ТЕ, их распределением, а также особенностями микроРНК, что отражается на их морфогенезе под действием стресса (Мустафин, 2018). Влияние ТЕ на динамику экспрессии генов при формировании тканей опосредовано взаимодействием с ЭГ факторами, такими как нкРНК, метилирование ДНК и модификации гистонов. У растений siРНК ответственны за РНК-зависимое метилирование ДНК (RdDM), которое подавляет ТЕ при их активации под действием стресса и событий гибридизации (Ito, 2012). Способность регулировать активность генов воздействием на целевое метилирование и на изменение модификации гистонов выявлена также у микроРНК и длинных нкРНК (Zhang et al., 2015), важными источниками которых являются ТЕ (Li et al., 2011; Kapusta et al., 2013; Lorenzetti et al., 2016; Cho, 2018). То есть в ходе эволюции ТЕ обрели способность саморегуляции продуктами процессинга собственных транскриптов, что имеет важное значение в управлении функционированием БКГ *in cis* и *in trans* (de Souza et al., 2013) и путем сайт-специфических транспозиций (Маркель, 2008; Feng et al., 2013; Sahebi et al., 2018).

Происходящие от ТЕ нкРНК способны оказывать регуляторное воздействие непосредственно на экспрессию БКГ, которые содержат последовательности, идентичные ТЕ (рис. 1). Это связано с важной ролью ТЕ в возникновении БКГ в ходе эволюции за счет одомашнивания

(Zdobnov et al., 2005; Lin et al., 2007; Feschotte, 2008; Dupressoir et al., 2012), образования ретрокопий (Kubiak, Makalowska, 2017) и экзонизации (Lin et al., 2008; Sela et al., 2010; Schmitz, Brosius, 2011; Tajnik et al., 2015). Корреляция между стрессовой индукцией ТЕ и активацией механизмов защиты клетки от стресса связана с наличием в составе ТЕ сайтов связывания с ТФ, которые индуцируют гены защитных систем клетки (Чересиз и др., 2008) и часто кооптируются геномами хозяев для собственных нужд в связи с их адаптивной ролью. Сохранение ТЕ в геномах хозяев обусловлено их участием в активации реакций ответа на стресс для выживаемости (Feschotte, 2008; de Souza et al., 2013; Ito et al., 2017).

Основными компонентами геномов растений являются LTR-РЭ. Они регулируются разнообразными ЭС, отобразая тонко настроенные ответы на данные стимулы, в основном в виде активации. Области LTR содержат аналогичные клеточным генам регуляторные мотивы и вовлечены в функциональную пластичность хозяев, действуя как диспергированные регуляторные модули, способные переориентировать стимулы стресса для соседних генов (Grandbastien, 2015). В ответ на стресс могут быть транскрипционно активированы как ТЕ, так и гены, расположенные вблизи инсерций. ТЕ служат важными источниками ЭГ факторов (Мустафин, Хуснутдинова, 2017), а большинство микроРНК растений идентичны или гомологичны ТЕ (Lorenzetti et al., 2016; Cho, 2018), поэтому для определения ответа растений на стресс исследуются микроРНК, играющие важную роль в управлении активности БКГ и ТЕ. Так, при изучении риса были обнаружены микроРНК, регулируемые такими ЭС, как засуха, холод и инсоляция. При этом 80 микроРНК из

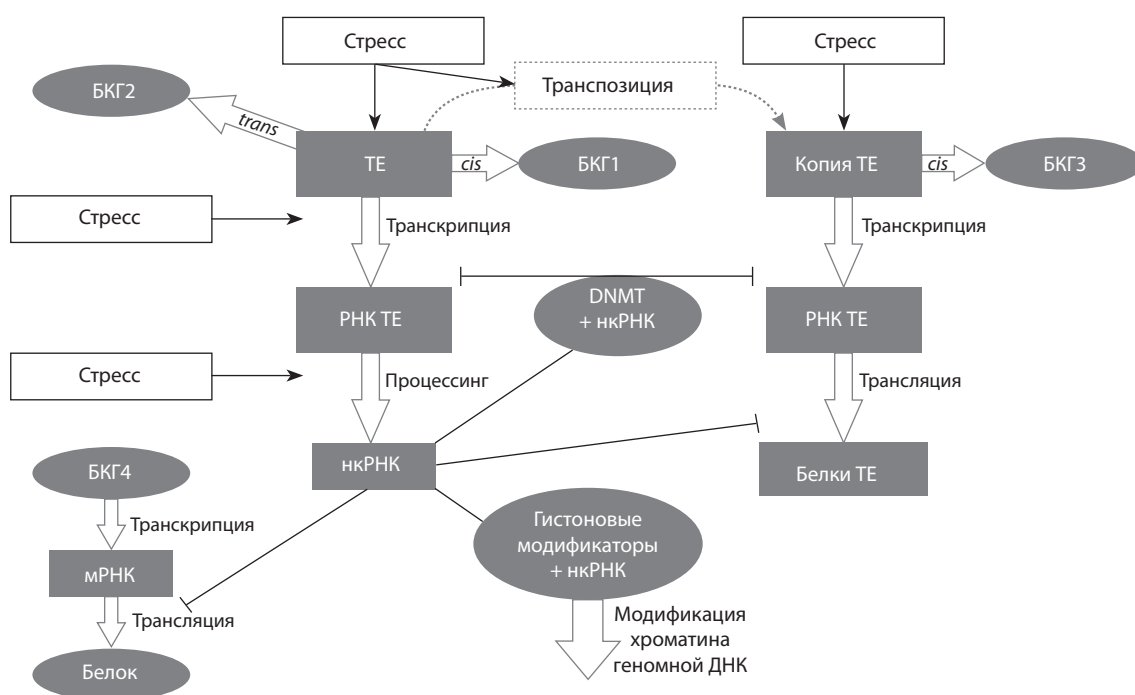


Рис. 1. Роль транспозонов в регуляции работы генома под действием стресса.

ТЕ – transposable elements (мобильные генетические элементы); БКГ – белок-кодирующий ген; нкРНК – некодирующая РНК; мРНК – матричная РНК; DNMT – DNA methyltransferase (ДНК-метилтрансфераза).

227 вновь выявленных произошли от TE (Barrera-Figueoa et al., 2012). Установлена активация LTR-РЭ у риса при избытке железа в почве. Оказалось, что LTR-РЭ способны усиливать экспрессию генов, участвующих в гомеостазе железа (Finatto et al., 2015).

Идеальной системой для изучения влияния TE на генную регуляцию является геном кукурузы, так как в нем содержится множество разных TE, чередующихся с БКГ. При анализе расположения генов вблизи TE и стресс-индуцированных транскриптов было показано, что эти TE могут выполнять энхансерную активность, которая стимулирует экспрессию чувствительных к стрессу генов. Получены данные о том, что TE служат важными источниками регуляции аллелей генов, чувствительных к абиотическому ЭС (Makarevitch et al., 2015). Поэтому произошедшие от TE сайты связывания с TF могут переписывать существующие транскрипционные сети, приводя к появлению новых адаптивных признаков, что важно для образования новых видов. Так, при видообразовании капусты TE амплифицировали сайты связывания с TF E2F, поэтому у некоторых видов капусты более 85 % всех E2F находятся в пределах TE (Henaff et al., 2014).

Активация транспозонов под действием стресса у животных

Влияние стресса на активацию TE подробно изучено на дрозофиле. Еще в 1985 г. было показано, что при тепловом шоке у *D. melanogaster* усиливается экспрессия РЭ *copia* и гена *hsp-10* (Strand, McDonald, 1985). В дальнейших исследованиях обнаружено, что характер активации *copia* различается в разных линиях *D. melanogaster* (Чересиз и др., 2008), что указывает на варьирование чувствительности TE к стрессу даже у особей в пределах одного вида. Вероятными причинами подобной изменчивости могут быть нарушения взаимоотношений TE с различными TF. Не исключено, что чувствительность TE к ЭС и стрессовым изменениям организма меняется в разных клеточных линиях одного организма под действием меняющейся экспрессии генов при дифференцировке. В связи с этим клетки разных органов и тканей могут проявлять специфическую восприимчивость TE в составе их геномов к стрессу. Высокочувствительными клетками являются нейроны головного мозга (Hunter, McEwen, 2013). Одним из механизмов воздействия стресса на головной мозг служит изменение ЭГ меток на разных стадиях развития в онтогенезе, за счет чего регулируется экспрессия специфических TE в зависимости от их расположения (Hunter, McEwen, 2013). Возможной причиной передачи устойчивости к стрессу могут быть особенности состава, распределения и способы активации TE в индивидуальном развитии, которые служат важными факторами ЭГ регуляции морфогенеза (Mustafin, Khusnutdinova, 2018b). То есть в естественном отборе сохраняются особи, особенности расположения и состава TE в геноме которых способствуют адаптации и выживанию при воздействии ЭС.

Эпигенетические факторы могут объяснить механизм, по которому ЭС вызывают длительные изменения физиологии и поведения. Стресс, а также стероидные гормоны влияют за счет изменения ЭГ маркеров (метиляции ДНК и модификаций гистонов) на пластичность в ряде

областей головного мозга, включая гиппокамп (Hunter et al., 2015), содержащий нейрональные стволовые клетки и характеризующийся активностью TE, необходимой для их дифференцировки в специфические нейроны разных областей головного мозга (Mustafin, Khusnutdinova, 2018a). Показано, например, что у крыс острый стресс вызывает значительное, специфичное для гиппокампа, усиление уровней H3K9me3, который нацелен на LTR-РЭ для сдерживания потенциальной геномной нестабильности (Hunter et al., 2012). Активирующим действием на некоторые TE обладает также стресс, вызванный вирусными инфекциями клеток хозяина. Так, заражение культур клеток вирусом герпеса, иммунодефицита человека и аденовирусом индуцирует транскрипцию SINE элементов (Чересиз и др., 2008).

Взаимосвязь гормонов и стресс-индуцированной активности транспозонов

На характер экспрессии TE влияют тип клеток и тканей (особенно в плаценте и зародышевых клетках), факторы старения и дифференцировки, цитокины, нарушающие функцию клеток агенты и стероиды (Taguscio, Mantovani, 2004). TE проявляют высокую чувствительность к гормонам, уровень которых, в свою очередь, отражает реакцию организма на стресс. Исходя из этого можно предположить, что управление онтогенезом при участии гормонов формировалось под воздействием изменений среды в ходе адаптации организмов с использованием TE, участвующих в регуляции экспрессии генов в различных клетках в зависимости от ткани и стадии развития. Это предположение основано на данных о ключевой роли ЭГ факторов в регуляции активности TE. В то же время сами TE служат источниками нкРНК (Lorenzetti et al., 2016; Cho, 2018), которые способны транслироваться в функциональные пептиды (miPEP) (Couzigou et al., 2016), регулирующие экспрессию генов. Предполагается, что пептидные гормоны могут влиять на ткане- и стадийноспецифическую активацию TE, используемую для управления экспрессией генов при росте и развитии организма (Mustafin, Khusnutdinova, 2018a). Это обусловлено возможностью miPEP усиливать экспрессию собственных микроРНК (Couzigou et al., 2016), участвующих в ЭГ регуляции TE (Mustafin, Khusnutdinova, 2017) (рис. 2).

Стресс и стероидные гормоны оказывают воздействие на структуры головного мозга, где выявлена высокая активность TE (Hunter et al., 2015), предположительно связанная с регуляторным эффектом транспозонов на дифференцировку нейрональных стволовых клеток (Mustafin, Khusnutdinova, 2018a). Взаимосвязь TE с гормонами выражается как в их чувствительности к стероидам и пептидам, так и в регуляторном воздействии инсерций TE на гены, влияющие на продукцию гормонов. Так, выявлена инсерция TE *Taguchi* в *cis*-регуляторную область гена экидиноксидазы, кодирующей ключевой фермент для уменьшения уровня линькового гормона 20-гидроксиэкидизона. Филогенетический анализ показал, что инсерция TE произошла при одомашнивании шелкопряда и оказалась адаптивной для *Bombyx mori*, поскольку используется в качестве энхансера, индуцирующего экспрессию 20-гидроксиэкидизона (Sun et al., 2014). За финальные стадии

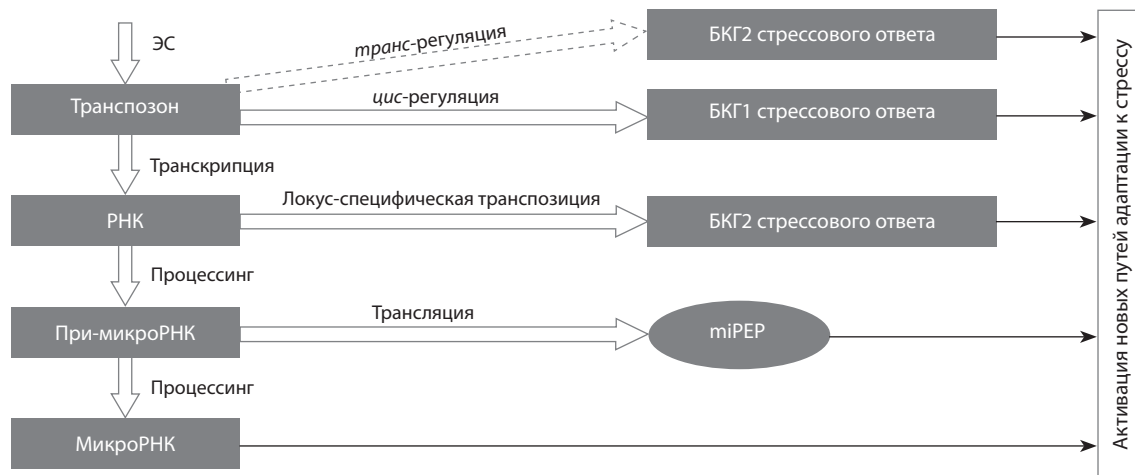


Рис. 2. Схема роли саморегуляции транспозонов в управлении стресс-индуцированной адаптивной изменчивостью геномов.

ЭС – экологические стрессоры; miPEP – пептиды, образуемые при трансляции при-микроРНК.

синтеза кортизола и альдостерона у человека отвечают гены *CYP11B1* и *CYP11B2* соответственно. Эти два гена гомологичны в проксимальных областях, однако инсерции *Alu* и *L1* стали причиной дивергенции промоторов (Cheng et al., 2012). У человека был выявлен микротранскрипционный механизм регуляции экспрессии гена *Tspo* и специфичный для гена *Tspo* стероидогенез, управляемый с помощью расположенного в его интроне SINE B2. Высокие уровни *TSPO* экспрессируются в клетках Лейдига в яичках, а уровни их экспрессии диктуют способность клеток формировать андрогены (Fan, Paradopoulos, 2012).

Исследование трансфекции промотора гена *DMBT1* (deleted in malignant brain tumors 1) с конструированием промотора показало, что сайт *Alu* длиной 3000 нуклеотидов левее гена обеспечивает его эстрогенную регуляцию. Обнаружено, что антагонисты эстрогена тамоксифен, ралоксифен и ICI 182,780 также индуцируют экспрессию гена через данный сайт *Alu* (Тынан et al., 2005). Было показано, что ORF-1p *L1*-элемента усиливает транскрипционную активность рецепторов андрогенов (AR) и экспрессию простат-специфического антигена (PSA) (Lu et al., 2013). У растений продуцируется большое количество гормональных веществ – фитостеролов, оказывающих разнообразное влияние на их развитие. В настоящее время широко доступны для изучения фитостеролов являются мутанты арабидопсиса по транспозонам (Suzuki, Muranaka, 2007). Таким образом, в ряде исследований показано, что гормоны могут изменять экспрессию ТЕ, тогда как сами транспозоны оказывают воздействие на продукцию гормонов за счет инсерций в специфические локусы и влияния на ЭГ регуляцию морфогенеза.

Тканеспецифическая и стадийспецифическая активация транспозонов

Способность ТЕ реагировать на определенные ЭС и стрессовые изменения организма, а также регуляторная роль ТЕ в масштабе всего генома, наряду с их успешным сохранением, говорит об универсальности стресс-индуцированной активности ТЕ в эволюции и онтогенезе.

В качестве стрессовых сигналов, воздействующих на активность определенных ТЕ, могут служить изменения внутриклеточной среды при последовательных делениях клеток, начиная с первого деления зиготы. В связи со специфическим составом и распределением ТЕ для каждого вида, активация определенных ТЕ может вызывать активацию одних БКГ посредством *цис*- и *транс*-регуляции (de Souza et al., 2013; Sahebi et al., 2018) и сайленсинг других БКГ посредством нкРНК, образуемых путем процессинга транскриптов ТЕ (Gim et al., 2014; Cho, 2018). В результате возможно формирование каскада последовательных изменений экспрессии БКГ, необходимых для дифференцировки клеток. Существование подобных эволюционно сложившихся механизмов регуляции онтогенеза при помощи ТЕ можно подтвердить, если подавление активности специфических ТЕ, необходимых для дальнейшей регуляции дифференцировки клеток, приведет к остановке развития организма. Действительно, в экспериментах на эмбрионах мышей было показано, что истощение длинной нкРНК *LincGET*, связанной с LTR-РЭ, приводит к полной остановке дальнейшего развития на двухклеточной стадии (Wang et al., 2016), в которую многие транскрипты иницируются из LTR-РЭ (Macfarlan et al., 2012) и связаны с энхансерами, поддерживающими плюрипотентность (Fort et al., 2014).

В эмбриогенезе ТЕ способны перераспределять регуляцию экспрессии БКГ в зависимости от стадии развития и типа ткани (Pavlicev et al., 2015). У мыши и человека ТЕ служат источниками не менее 30 % стартовых сайтов транскрипции с тканеспецифическими особенностями активации (Gerdes et al., 2016). Из РЭ в раннем эмбриогенезе мыши иницируется до 20 % транскриптома. В эволюции специфические транспозиции РЭ стали основой для распределения тканеспецифических сайтов связывания с ТФ (Mak et al., 2014). На основании экспериментальных данных о накоплении инсерций LINE-1 в эмбриональных стволовых клетках человека, сопровождаемых подавлением активности определенных генов, была показана роль ТЕ в регуляции работы генома при дифференцировке

клеток (Garcia-Perez et al., 2007). Профили специфических ТЕ могут свидетельствовать о клеточной идентичности, что говорит о важном значении ТЕ в управлении работой генома при дифференцировке клеток. Доказана способствующая поддержанию плюрипотентности активная транскрипция ТЕ и реактивация определенных РЭ в раннем эмбриональном развитии животных по линиям стволовых клеток (Gerdes et al., 2016).

ТЕ служат важнейшими источниками сайтов связывания с ТФ, характеризующихся способностью к активации в зависимости от ткани и стадии развития (Lowe, Haussler, 2012; de Souza et al., 2013). Сайты связывания с ТФ, которые произошли от LTR-РЭ, отличаются ткане- и стадиейспецифическими особенностями активации (Ito et al., 2017). Кроме того, ТЕ могут управлять тканеспецифическими особенностями экспрессии генов за счет предоставления сайтов сплайсинга и нетранслируемых областей, так как альтернативные варианты транслируемых белков обладают различными свойствами (Lin et al., 2008; Tajnik et al., 2015). Было показано, что ЭГ управление функцией ТЕ, расположенных в интронах генов, способствует изменению их регуляции в онтогенезе и особенностям экспрессии (Saze, 2018). В тканевых культурах человека выявлено тканеспецифическое расщепление экспрессии генов по 62 различным классам LTR в 18 типах тканей и предложена роль ТЕ в тканеспецифической регуляции экспрессии генов в онтогенезе (Pavlicev et al., 2015). Non-LTR-РЭ обладают функциями, сходными с длинными нкРНК, регулируя экспрессию БКГ при дифференцировке стволовых клеток в эмбриогенезе (Honson, Macfarlan, 2018). В то же время у человека различные длинные нкРНК, образующиеся из ретровируса HERVH, экспрессируются и необходимы для плюрипотентности стволовых клеток (Ramsay et al., 2017).

Горизонтальный перенос транспозонов в эволюции

Помимо особенностей распределения ТЕ в геномах эукариот, важную роль для видообразования играет состав ТЕ, изменяемый благодаря горизонтальному переносу. У прокариот горизонтальный перенос играет основную роль в эволюции, в данный процесс вовлечено более 81 % их генов (Palazzo et al., 2017). В эволюции животных отмечен характер распространения ТЕ при помощи горизонтального переноса, подобно межвидовым вирусным пандемиям. Например, около 46 млн лет назад произошел крупный всплеск активности ДНК-ТЕ семейства *SPIN*, благодаря чему их последовательности идентичны на 96 % у самых разнообразных животных (африканская когтистая лягушка, ящерица анолис, сенегальский галаго, крыса, мышь, коричневая летучая мышь) (Pace et al., 2008). У животных впервые горизонтальный перенос транспозонов был показан у *D. melanogaster* (Daniels et al., 1990). В дальнейших исследованиях выявлена способность к горизонтальному переносу большинства ТЕ у насекомых, рептилий, челюстных рыб, миног и млекопитающих (Zhang et al., 2014).

Предполагается, что гены RAG, образующие необходимый для V(D)J рекомбинации комплекс, у челюстных позвоночных возникли благодаря горизонтальному пе-

реносу ТЕ (Snieszewski et al., 2018). У насекомого *Helicoverpa zea* была обнаружена транспозаза Transib, обладающая сходными с RAG свойствами. Это говорит о возможностях горизонтального переноса в эволюции и филогенетическом родстве генов ТЕ, одомашненных геномами различных видов эукариот (Hencken et al., 2012). Филогенетические исследования позволили выявить горизонтальный перенос РЭ семейства *An-RTE* у покрытосеменных растений от предковых членистоногих. У 42 видов животных РЭ показали значительную идентичность с *An-RTE* цветковых растений (Gao et al., 2018). В международной базе данных о горизонтальном переносе (Horizontal Transposon Transfer DataBase – <http://lpa.saogabriel.unipampa.edu.br:8080/httdatabase/>) большое внимание уделено горизонтальному переносу эукариот (Dotto et al., 2018).

В настоящее время активно изучаются механизмы горизонтального переноса между различными таксонами. Один из способов распространения ТЕ путем горизонтального переноса был продемонстрирован на примере ТЕ *Bari*, относящегося к суперсемейству *Tc1-mariner*, которые в эволюции приобрели свойство «размытых промоторов» и могут перемещаться между различными геномами (Palazzo et al., 2017). В качестве векторов для горизонтального переноса ТЕ могут выступать вирусы. Так, для ТЕ *Chapaev* в качестве вектора может выступать *Bracovirus*. Благодаря горизонтальному переносу, *Chapaev* элементы широко распространены в геномах многих видов животных (Zhang et al., 2014).

Транспозоны обнаруживаются в составе геномов гигантских вирусов, где они участвуют в функционировании и эволюционных преобразованиях, и не исключен их перенос в геномы хозяев (Filee, 2018). Так, в составе *Pandoravirus salinus* имеется ТЕ *Submariner*. Хозяином данного пандоравируса является амеба *Acanthamoeba castellanii*, в геноме которой выявлены ТЕ *Submariner* и связанные с ними ДНК-ТЕ, что говорит о наличии горизонтального переноса между вирусом и хозяином (Sun et al., 2015). Кроме того, вирусы способны активировать ТЕ; например, цитомегаловирусная инфекция может вызывать экспрессию HERV (Assinger et al., 2013). В то же время ТЕ могут участвовать как в интеграции вирусных геномов в ДНК хозяев (Speiseder et al., 2014; Tarocchi et al., 2014), так и в защите от вирусных инфекций. Например, у животных показана способность ERV вызывать рестрикцию родственных экзогенных ретровирусов (Malfavon-Borja, Feschotte, 2015). Описана способность взаимопревращений ERV в экзогенные ретровирусы, а последних – обратно в РЭ в геномах различных хозяев (Zhuo, Feschotte, 2015). От LTR-РЭ произошли вирусы семейства *Caulimoviridae* у растений (Llorens et al., 2009). Анализ литературных данных показал, что взаимосвязь ТЕ и вирусов в эволюции эукариот является глобальной и играет важнейшее значение в изменчивости геномов хозяев. В ряде исследований показаны взаимопревращения вирусов и ТЕ (Zhuo, Feschotte, 2015), а также существование элементов, объединяющих в себе свойства вирусов и транспозонов. Промежуточным эволюционным звеном между ДНК-ТЕ и вирусами являются вирофаги (Fisher, Suttle, 2011). Выявлены вирофаги RVP, представляющие собой гибрид

виофагов с полинтонами, способный вызвать вирусные инфекции (Yutin et al., 2015). Свойствами ТЕ и вирусов обладают также полинтоны, существующие как автономные и неавтономные элементы и распространенные среди различных видов животных, грибов и протистов. Предполагают, что от полинтонов произошли многие вирусы эукариот, включая мегавирусы и аденовирусы (Kurovic, Koonin, 2016).

Заключение

Накоплено достаточно экспериментальных данных, подтверждающих чувствительность ТЕ к стрессу у всех живых организмов. Активация ТЕ под действием стресса ведет к изменению и появлению новых регуляторных генных сетей, способствующих изменчивости. Это важнейший фактор естественного отбора особей, обладающих специфическим составом и расположением в их геномах ТЕ, активация которых под действием стресса в онтогенезе способствует адаптации.

Изучение влияния определенных стрессорных воздействий на активацию ТЕ в разных тканях и в различные стадии развития может стать ключом к выяснению механизмов экологического морфогенеза. Данные исследования перспективны для диагностических и терапевтических моделей в биологии, генетике и биохимии. Определение роли микроРНК и гормонов в изменении дифференцировки клеток под влиянием ТЕ перспективно для планирования таргетной терапии патологий, связанных с дисфункцией эпигенетических факторов, а также возможного воздействия на процессы старения. Исследование различных ТЕ, способных к сайт-специфической транспозиции, перспективно для модулирования роста и развития организмов, что важно для использования стволовых клеток в органозамещающих технологиях. Сравнение чувствительности к стрессу определенных ТЕ различных видов является предпосылкой для изучения изменений регуляторных генных сетей в эволюции.

Список литературы / References

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В. Стрессовая индукция транспозиций ретротранспозонов дрозофилы: реальность явления, характерные особенности и возможная роль в быстрой эволюции. *Генетика*. 1997;33(8):1083-1093.
[Vasileva L.A., Ratner V.A., Bubenshchikova E.V. Stress induction of retrotransposon transpositions in *Drosophila*: reality of the phenomenon, characteristic features, and possible role in rapid evolution. *Russ. J. Genet.* 1997;33(8):918-927.]
Кайданов Л.З., Галкин А.П., Иовлева О.В., Сиделева О.Г. Направленные перемещения по геному мобильного элемента хобо в длительно селекционируемой линии *HA Drosophila melanogaster*. *Цитология и генетика*. 1996;30(1):23-30.
[Kaidanov L.Z., Galkin A.P., Iovleva O.V., Sideleva O.G. Directed transpositions in the genome of the hobo mobile element in a long selected strain of *Drosophila melanogaster*. *Tsitologiya i Genetika* = *Cytology and Genetics*. 1996;30(1):23-30. (in Russian)]
Маркель А.Л. Стресс и эволюция. *Вестн. ВОГиС*. 2008;12(1/2): 206-215.
[Markel A.L. Stress and evolution. *Vestnik VOGiS* = *Herald of Vavilov Society for Geneticists Breeding Scientists*. 2008;12(1/2): 206-215. (in Russian)]
Мустафин Р.Н. Особенности эпигенетической регуляции онтогенеза растений. *Успехи соврем. биологии*. 2018;138(3):227-242.

[Mustafin R.N. Specific features of the epigenetic regulation of plant ontogenesis. *Uspekhi Sovremennoi Biologii* = *Biology Bulletin Reviews*. 2018;138(3):227-242. (in Russian)]
Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(6):742-749.
[Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(6): 742-749. (in Russian)]
Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984.
[Khesin R.B. *Genome Inconstancy*. Moscow: Nauka Publ., 1984. (in Russian)]
Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. Мобильные элементы и стресс. *Вестн. ВОГиС*. 2008;12(1/2):216-241.
[Cheresiz S.V., Yurchenko N.N., Ivannikov A.V., Zakharov I.K. Transposable elements and stress. *Vestnik VOGiS* = *Herald of Vavilov Society for Geneticists Breeding Scientists*. 2008;12(1/2): 216-241. (in Russian)]
Assinger A., Yaiw K.C., Gottesdorfer I., Leib-Mosch C., Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus (HCMV) induces human endogenous retrovirus (HERV) transcription. *Retrovirology*. 2013;10: 132. DOI 10.1186/1742-4690-10-132.
Barrera-Figueroa B.E., Gao L., Wu Z., Zhou X., Zhu J., Jin H., Liu R., Zhu J.K. High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. *BMC Plant Biol.* 2012;12:132.
Cheng L.C., Pai T.W., Li L.A. Regulation of human *CYP11B1* and *CYP11B2* promoters by transposable elements and conserved cis elements. *Steroids*. 2012;77:100-109.
Cho J. Transposon-derived non-coding RNAs and their function in plants. *Front. Plant Sci.* 2018;9:600.
Couzigou J.M., Andre O., Guillotin B., Alexandre M., Combier J.P. Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *New Phytol.* 2016;211(2):379-381.
Curran S.C. Exploring *Eucladoceros* ecomorphology using geometric morphometrics. *Anat. Rec.* 2015;298:291-313.
Daniels S.B., Peterson K.R., Strausbaugh L.D., Kidwell M.G., Chovnick A. Evidence for horizontal transmission of the *P* transposable element between *Drosophila* species. *Genetics*. 1990;124(2):339-355.
de Souza F.S., Franchini L.F., Rubinstein M. Exaptation of transposable elements into novel *cis*-regulatory elements: is the evidence always strong? *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(6):1239-1251.
Deng P., de Vargas Roditi L., van Ditmarsch D., Xavier J.B. The ecological basis of morphogenesis: branching patterns in swarming colonies of bacteria. *New J. Phys.* 2014;16:15006. DOI 10.1088/1367-2630/16/1/015006.
Dotto B.R., Carvalho E.L., da Silva A.F., Dezordi F.Z., Pinto P.M., Campos T.L., Rezende A.M., Wallau G.D.L. HTT-DB: new features and updates. *Database (Oxford)*. 2018;bax102. DOI 10.1093/database/bax102.
Down R.H., Pelizzola M., Schmitz R.J., Lister R., Downen J.M., Nery J.R., Dixon J.E., Ecker J.R. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109:E2183-E2191.
Dupressoir A., Lavialle C., Heidmann T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placenta. *Placenta*. 2012;33:663-671.
Fan J., Papadopoulos V. Transcriptional regulation of translocator protein (*Tspo*) via a SINE B2-mediated natural antisense transcript in MA-10 Leydig cells. *Biol. Reprod.* 2012;86(5):147.
Feng G., Leem Y.E., Levin H.L. Transposon integration expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(2):775-789.
Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat. Rev. Genet.* 2008;9:397-405.
Filee J. Giant viruses and their mobile genetic elements: the molecular symbiosis hypothesis. *Curr. Opin. Virol.* 2018;33:81-88.

- Finatto T., de Oliveira A., Chaparro C., da Maia L.C., Farias D.R., Woyann L.G., Mistura C.C., Soares-Bresolin A.P., Llauro C., Pinaud O., Picault N. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. *Rice*. 2015;8:13.
- Fischer M.G., Suttle C.A. A virophage at the origin of large DNA transposons. *Science*. 2011;332(6026):231-234.
- Fort A., Hashimoto K., Yamada D., Salimullah M., Keya C.A., Saxena A., Bonetti A., Voineagu I., Bertin N., Kratz A., Noro Y., Wong C.H., de Hoon M., Andersson R., Sandelin A., Suzuki H., Wei C.L., Koseki H., FANTOM Consortium, Hasegawa Y., Forrest A.R., Carninci P. Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports maintenance. *Nat. Genet.* 2014;46:558-566.
- Gao D., Chu Y., Xia H., Xu C., Heyduk K., Abernathy B., Ozias-Akins P., Leebens-Mack J.H., Jackson S.A. Horizontal transfer of non-LTR retrotransposons from arthropods to flowering plants. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(2):354-364.
- Garcia-Perez J.L., Marchetto M.C., Muotri A.R., Coufal N.G., Gage F.H., O'Shea K.S., Moran J.V. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16:1569-1577.
- Gerdes P., Richardson S.R., Mager D.L., Faulkner G.J. Transposable elements in the mammalian embryo: pioneers surviving through stealth and service. *Genome Biol.* 2016;17:100.
- Gim J., Ha H., Ahn K., Kim D.S., Kim H.S. Genome-wide identification and classification of microRNAs derived from repetitive elements. *Genomic Inform.* 2014;12:261-267.
- Grandbastien M.A. LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015;1849(4):403-416.
- Henaff E., Vives C., Desvoves B., Chaurasia A., Payet J., Gutierrez C., Casacuberta J.M. Extensive amplification of the E2F transcription factor binding sites by transposons during evolution of *Brassica* species. *Plant J.* 2014;77:852-862.
- Hencken C.G., Li X., Craig N.L. Functional characterization of an active Rag-like transposase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19(8):834-836. DOI 10.1038/nsmb.2338.
- Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development. *Dev. Cell*. 2018;46(2):132-134.
- Hunter R.G., Gagnidze K., McEwen B.S., Pfaff D.W. Stress and the dynamic genome: steroids, epigenetics, and the transposome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(22):6828-6833.
- Hunter R.G., McEwen B.S. Stress and anxiety across the lifespan: structural plasticity and epigenetic regulation. *Epigenomics*. 2013;5(2):177-194.
- Hunter R.G., Murakami G., Dewell S., Seligsohn M., Baker M.E., Datson N.A., McEwen B.S., Pfaff D.W. Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:17657-17662.
- Ito H. Small RNAs and transposon silencing in plants. *Dev. Growth Differ.* 2012;54(1):100-107.
- Ito H., Kim J.M., Matsunaga W., Saze H., Matsui A., Endo T.A., Harukawa Y., Takagi H., Yaegashi H., Masuta Y., Masuda S., Ishida J., Tanaka M., Takahashi S., Morosawa T., Toyoda T., Kakutani T., Kato A., Seki M. A stress-activated transposon in *Arabidopsis* induces transgenerational abscisic acid insensitivity. *Sci. Rep.* 2016;6:23181. DOI 10.1038/srep23181.
- Ito J., Suqimoto R., Nakaoka H., Yamada S., Kimura T., Hayano T., Inoue I. Systematic identification and characterization of regulatory elements derived from human endogenous retroviruses. *PLoS Genet.* 2017;13(7):e1006883.
- Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J., Zhuo X., Ramsay L., Bourgue G., Yandell M., Feschotte C. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003470.
- Kojima K.K. Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. *Genes Genet. Syst.* 2018;9:1-20. DOI 10.1266/ggs.18-0024.
- Krupovic M., Koonin E.V. Self-synthesizing transposons: unexpected key players in the evolution of viruses and defense systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016;31:25-33.
- Kubiak M.R., Makalowska I. Protein-coding genes' retrocopies and their functions. *Viruses*. 2017;9(4):80.
- Le T.N., Schuman U., Smith N.A., Tiwari S., Au P.C., Zhu Q.H., Taylor J.M., Kazan K., Llewellyn D.J., Zhang R., Dennis E.S., Wang M.B. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 2014;15:458.
- Li Y., Li C., Xia J., Jin Y. Domestication of transposable elements into microRNA genes in plants. *PLoS One*. 2011;6:e19212.
- Lin L., Shen S., Tye A., Cai J.J., Jiang P., Davidson B.L., Xing Y. Diverse splicing patterns of exonized Alu elements in human tissues. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000225.
- Lin R., Ding L., Casola C., Ripoll D.R., Feschotte C., Wang H. Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science*. 2007;318:1302-1305.
- Llorens C., Munoz-Pomer A., Bernad L., Botella H., Moya A. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. *Biol. Direct*. 2009;4:41-72.
- Lorenzetti A.P.R., de Antonio G.Y.A., Paschoal A.R., Domingues D.S. Plant TE-MIR DB: a database for transposable element-related microRNAs in plant genomes. *Funct. Integr. Genomics*. 2016;16:235-242.
- Lowe C.B., Haussler D. 29 mammalian genomes reveal novel exaptations of mobile elements for likely regulatory functions in the human genome. *PLoS One*. 2012;7(8):e43128.
- Lu Y., Feng F., Yang Y., Gao X., Cui J., Zhang C., Zhang F., Xu Z., Qv J., Wang C., Zeng Z., Zhu Y., Yang Y. LINE-1 ORF-1p functions as a novel androgen receptor co-activator and promotes the growth of human prostatic carcinoma cells. *Cell. Signal*. 2013;25:479-489.
- Macfarlan T.S., Gifford W.D., Driscoll S., Lettieri K., Rowe H.M., Bonanomi D., Firth A., Singer O., Trono D., Pfaff S.L. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*. 2012;487(7405):57-63.
- Mak K.S., Burdach J., Norton L.J., Pearson R.C., Crossley M., Funnell A.P. Repression of chimeric transcripts emanating from endogenous retrotransposons by a sequence-specific transcription factor. *Genome Biol.* 2014;15(4):R58.
- Makarevitch I., Waters A.J., West P.T., Stitzer M., Hirsch C.N., Ross-Ibarra J., Springer N.M. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. *PLoS Genet.* 2015;11(1):e1004915.
- Malfavon-Borja R., Feschotte C. Fighting fire with fire: endogenous retrovirus envelopes as restriction factors. *J. Virol.* 2015;89(8):4047-4050.
- McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 1984;226:792-801.
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Epigenetic hypothesis of the role of peptides in aging. *Adv. Gerontol.* 2018a;8(3):200-209.
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in emergence of Metazoa. *Biochemistry (Moscow)*. 2018b;83(3):185-199.
- Pace J.K., Gilbert C., Clark M.S., Feschotte C. Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(44):17023-17028.
- Palazzo A., Caizzi R., Viggiano L., Marsano R.M. Does the promoter constitute a barrier in the horizontal transposon transfer process? Insight from *Bari* transposons. *Genome Biol. Evol.* 2017;9(6):1637-1645.
- Pavlicev M., Hiratsuka K., Swaggart K.A., Dunn C., Muglia L. Detecting endogenous retrovirus-driven tissue-specific gene transcription. *Genome Biol. Evol.* 2015;7:1082-1097.
- Ramsay L., Marchetto M.C., Caron M., Chen S.H., Busche S., Kwan T., Pastinen T., Gage F.H., Bourgue G. Conserved expression of transposon-derived non-coding transcripts in primate stem cells. *BMC Genomics*. 2017;18:214-226.

- Roberts A.P., Chandler M., Courvalin P., Guedon G., Mullany P., Pembroke T., Rood J.I., Smith C.J., Summers A.O., Tsuda M., Berg D.E. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*. 2008;60:167-173.
- Sahebi M., Hanafi M.M., van Wijnen A.J., Rice D., Rafii M.Y., Azizi P., Osman M., Taheri S., Bakar M.F.A., Isa M.N.M., Noor Y.M. Contribution of transposable elements in the plant's genome. *Gene*. 2018; 665:155-166.
- Saze H. Epigenetic regulation of intragenic transposable elements: a two-edged sword. *J. Biochem*. 2018;164:323-328.
- Schmitz J., Brosius J. Exonization of transposed elements: a challenge and opportunity for evolution. *Biochimie*. 2011;93:1928-1934.
- Sela N., Kim E., Ast G. The role of transposable elements in the evolution of non-mammalian vertebrates and invertebrates. *Genome Biol*. 2010;11:R59.
- Snieszewski L., Janik S., Laszkiewicz A., Majkowski M., Kisielow P., Cebat M. The evolutionary conservation of the bidirectional activity of the *NWC* gene promoter in jawed vertebrates and the domestication of the *RAG* transposon. *Dev. Comp. Immunol*. 2018;81: 105-115.
- Speiseder T., Nevels M., Dobner T. Determination of the transforming activities of adenovirus oncogenes. *Methods Mol. Biol*. 2014; 1089:105-115.
- Strand D.J., McDonald J.F. Copia is transcriptionally responsive to environmental stress. *Nucleic Acids Res*. 1985;13:4401-4410.
- Sun C., Feschotte C., Wu Z., Mueller R.L. DNA transposons have colonized the genome of the giant virus *Pandoravirus salinus*. *BMC Biol*. 2015;13:38.
- Sun W., Schen Y.H., Han M.J., Cao Y.F., Zhang Z. An adaptive transposable element insertion in the regulatory region of the *EO* gene in domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol*. 2014;31: 3302-3313.
- Suzuki M., Muranaka T. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids*. 2007;42:47-54.
- Tajnik M., Vigilante A., Braun S., Hanel H., Luscombe N.M., Ule J., Zarnack K., Konig J. Inergenic *Alu* exonisation facilitates the evolution of tissue-specific transcript ends. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: 10492-10505.
- Tarocchi M., Polvani S., Marroncini G., Galli A. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol*. 2014;20(33):11630-11640.
- Taruscio D., Mantovani A. Factors regulating endogenous retroviral sequences in human and mouse. *Cytogenet. Genome Res*. 2004;105: 351-362.
- Todeschini A.L., Morillon A., Springer M., Lesage P. Severe adenine starvation activates Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 2005;25:7459-7472.
- Tynan S., Pacia E., Haynes-Johnson D., Lawrence D., D'Andrea M.R., Guo J.Z., Lundeen S., Allan G. The putative tumor suppressor deleted in malignant brain tumors 1 is an estrogen-regulated gene in rodent and primate endometrial epithelium. *Endocrinology*. 2005; 146:1066-1073.
- Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. 1942;150:563-565.
- Waddington C.H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature*. 1959;183:2654-2655.
- Walser J.C., Chen B., Feder M. Heat-shock promoters: targets for evolution by *P* transposable elements in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2006; 2:1541-1555.
- Wang J., Li X., Wang L. A novel long intergenic noncoding RNA indispensable for the cleavage of mouse two-cell embryos. *EMBO Rep*. 2016;17:1452-1470.
- Wheeler B.S. Small RNAs, big impact: small RNA pathways in transposon control and their effect on the host stress response. *Chromosome Res*. 2013;21:587-600.
- Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavel A., Leory P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A.H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet*. 2007;8:973-982.
- Yutin N., Shevchenko S., Kapitonov V., Krupovic M., Koonin E.V. A novel group of diverse Polinton-like viruses discovered by metagenome analysis. *BMC Biol*. 2015;13:95.
- Zdobnov E.M., Campillos M., Harrington E.D., Torrents D., Bork P. Protein coding potential of retroviruses and other transposable elements in vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:946-954.
- Zhang G., Esteve P., Chin H.G., Terragni J., Dai N., Correa I.R., Jr., Pradhan S. Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(12):6112-6124.
- Zhang H., Feschotte C., Han M., Zhang Z. Recurrent horizontal transfers of *Chaparev* transposons in diverse invertebrate and vertebrate animals. *Genome Biol. Evol*. 2014;6(6):1375-1386.
- Zhang Z., Saier M.H., Jr. Transposon-mediated adaptive and directed mutations and their potential evolutionary benefits. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 2012;21(1-2):59-70.
- Zhuo X., Feschotte C. Cross-species transmission and differential fate of an endogenous retrovirus in three mammal lineages. *PLoS Pathog*. 2015;11(11):e1005279. DOI 10.1371/journal.ppat.1005279.

ORCID ID

R.N. Mustafin orcid.org/0000-0002-4091-382X
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.11.2018. После доработки 17.12.2018. Принята к публикации 22.01.2019.

The regulatory role of cystatin C in autophagy and neurodegeneration

T.A. Korolenko¹✉, A.B. Shintyapina², A.B. Pupyshev¹, A.A. Akopyan¹, G.S. Russkikh³, M.A. Dikovskaya^{1, 6}, V.A. Vavilin^{2, 5}, E.L. Zavjalov⁵, M.A. Tikhonova^{1, 4}, T.G. Amstislavskaya^{1, 4}

¹ Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Novosibirsk, Russia

² Scientific Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Basic and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

³ Scientific Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Basic and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁶ S.N. Fedorov NMRC "MNTK "Eye Microsurgery", Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: t.a.korolenko@physiol.ru

Autophagy is a dynamic cellular process involved in the turnover of proteins, protein complexes, and organelles through lysosomal degradation. It is particularly important in neurons, which do not have a proliferative option for cellular repair. Autophagy has been shown to be suppressed in the striatum of a transgenic mouse model of Parkinson's disease. Cystatin C is one of the potent regulators of autophagy. Changes in the expression and secretion of cystatin C in the brain have been shown in amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's and Parkinson's diseases, and in some animal models of neurodegeneration, thus proving a protective function of cystatin C. It has been suggested that cystatin C plays the primary role in amyloidogenesis and shows promise as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases (Alzheimer's and Parkinson's diseases). Cystatin C colocalizes with the amyloid β -protein in the brain during Alzheimer's disease. Controlled expression of a cystatin C peptide has been proposed as a new approach to therapy for Alzheimer's disease. In Parkinson's disease, serum cystatin C levels can predict disease severity and cognitive dysfunction, although the exact involvement of cystatin C remains unclear. The aim: to study the role of cystatin C in neurodegeneration and evaluate the results in relation to the mechanism of autophagy. In our study on humans, a higher concentration of cystatin C was noted in cerebrospinal fluid than in serum; much lower concentrations were observed in other biological fluids (intraocular fluid, bile, and sweat). In elderly persons (61–80 years old compared to practically healthy people at 40–60 years of age), we revealed increased cystatin C levels both in serum and intraocular fluid. In an experiment on C57Bl/6J mice, cystatin C concentration was significantly higher in brain tissue than in the liver and spleen: an indication of an important function of this cysteine protease inhibitor in the brain. Using a transgenic mouse model of Parkinson's disease (5 months old), we demonstrated a significant increase in osmotic susceptibility of brain lysosomes, depending on autophagy, while in a murine model of Alzheimer's disease, this parameter did not differ from that in the appropriate control.

Key words: cystatin C; autophagy; neurodegeneration.

For citation: Korolenko T.A., Shintyapina A.B., Pupyshev A.B., Akopyan A.A., Russkikh G.S., Dikovskaya M.A., Vavilin V.A., Zavjalov E.L., Tikhonova M.A., Amstislavskaya T.G. The regulatory role of cystatin C in autophagy and neurodegeneration. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4): 390-397. DOI 10.18699/VJ19.507

Регуляторная роль цистатина С в аутофагии и нейродегенерации

Т.А. Короленко¹✉, А.Б. Шинтыпина², А.Б. Пупышев¹, А.А. Акопян¹, Г.С. Русских³, М.А. Диковская^{1, 6}, В.А. Вавилин^{2, 5}, Е.Л. Завьялов⁵, М.А. Тихонова^{1, 4}, Т.Г. Амстиславская^{1, 4}

¹ Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт биохимии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

⁶ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова», Новосибирское отделение, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: t.a.korolenko@physiol.ru

Аутофагия – динамичный клеточный процесс, связанный с оборотом белков, белковых комплексов и оргanelл посредством лизосомной деградации. Аутофагия особенно важна в нейронах, которые не имеют пролиферативного ресурса для клеточного восстановления. Одним из мощных регуляторов аутофагии является цистатин С. Изменения экспрессии и секреции цистатина С в головном мозге показаны при боковом амиотрофическом склерозе, болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также на некоторых моделях нейроде-

генерации у животных, что подтверждает защитную функцию цистатина С. Высказано предположение, что цистатин С играет важную роль в амилоидогенезе и может рассматриваться как возможное терапевтическое средство для предупреждения и лечения ряда нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера и Паркинсона). Цистатин С колокализуется с амилоидом β в головном мозге при болезни Альцгеймера. Контролируемая экспрессия пептида цистатина С предложена в качестве нового подхода к терапии болезни Альцгеймера. При болезни Паркинсона уровни цистатина С в сыворотке крови могут прогнозировать тяжесть заболевания и когнитивную дисфункцию, хотя конкретное участие цистатина С остается неясным. Рассмотрена роль цистатина С в нейродегенерации и проведена оценка результатов в связи с активностью аутофагии. У здоровых людей обнаружена высокая концентрация цистатина С в спинномозговой жидкости по сравнению с сывороткой крови; значительно более низкие концентрации наблюдали в других биологических жидкостях (внутриглазная жидкость, желчь, пот). При оценке влияния возраста обнаружено повышение концентрации цистатина С как в сыворотке, так и во внутриглазной жидкости у пожилых людей (61–80 лет) по сравнению с практически здоровыми людьми в возрасте 40–60 лет. В эксперименте на мышах C57Bl/6J концентрация цистатина С была значительно выше в мозговой ткани, чем в печени и селезенке, что указывает на важную функцию этого ингибитора цистеиновых протеаз в головном мозге. На трансгенной мышинной модели болезни Паркинсона (5 месяцев) найдено значительное увеличение осмотической чувствительности лизосом мозга, соответствующее усилению аутофагии, тогда как на мышинной модели болезни Альцгеймера этот показатель не обнаружил изменения аутофагии.

Ключевые слова: цистатин С; аутофагия; нейродегенерация.

Introduction

The search for new markers of aging, neurodegenerative diseases, and atherosclerosis is important for modern medicine (Ciechanover, Kwon, 2015). Cystatins are known to be potent endogenous inhibitors of cysteine proteases of the papain superfamily and form equimolar, tight, and reversible complexes with human cysteine proteases (cathepsins B, H, K, L, and S) (Stoka et al., 2005; Korolenko et al., 2011, 2015).

Cystatin C is a known extracellular endogenous cysteine proteinase inhibitor, which has been studied more thoroughly than other cystatins (cystatin SN et al.) and has been evaluated as a possible marker of several pathological processes (tumor growth and metastasis) (Poteryaeva et al., 2000; Maxfield, 2014). Increased serum cystatin C concentration is well known as an alternative measure of renal function (Keppler, 2006). According to the recent findings cystatin C is regulated at both transcriptional and post-translational levels (Xu et al., 2015), moreover, cystatin C production by haematopoietic cells is significant in the systematic pools of this inhibitor.

Neurodegenerative diseases combine disturbances in certain structures of brain cells (especially in endosomes and lysosomes), which, in the presence of the signs of such a disease, include some common molecular and cellular mechanisms (Harris, Rubinsztein, 2011). Protective mechanisms of action of cystatin C in several neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease) were suggested (Gauthier et al., 2011). Cystatin C was shown previously implicated in the process of neurodegeneration (Kaur, Levy, 2012). An *in vivo* study on dopaminergic-neuron survival revealed that administration of cystatin C to rats with a neurotoxin 6-hydroxydopamine-induced lesion partially rescues substantia nigra dopaminergic neurons. 6-Hydroxydopamine-mediated lesioning induces relatively slow but sustained upregulation of cystatin C and suggests that this inhibitor may exert a neuroprotective action on dopaminergic neurons (Xu et al., 2005). Those authors show that cysteine proteinase inhibitors may be new candidates for neuroprotective treatment of Parkinson's disease (Cuervo, Wong, 2014).

We tried to evaluate the biological role of cystatin C in neurodegeneration, especially as autophagy inducer, which remains unclear and controversial until now. Destruction of the

nigrostriatal dopaminergic pathway can trigger neuroinflammation and increase the synthesis of neural growth factors, both in the striatum and in the substantia nigra. In general, the pathological processes involved in such responses are poorly characterized and may contribute to secondary damage and/or regeneration in the central nervous system (Ling, Salvaterra, 2009; Harris, Rubinsztein, 2011). Increased levels of p62 (also called as sequestosome 1 (SQSTM1) and higher sensitivity to 7-oxysterol-mediated lysosomal membrane damage was shown in macrophages isolated from cystatin C knockout (CysC^{-/-}) mice (Li et al., 2016).

Cystatin C as a possible diagnostic marker of neurodegenerative diseases

Cystatin C has a broad spectrum of biological roles, including modulation of inflammatory response (Li et al., 2016). Using immunohistochemical methods in Alzheimer's disease Zhong et al. (2013) have revealed that cystatin C co-localizes with amyloid- β in amyloid-laden vascular walls and in the senile plaque cores. These authors suggested that cystatin C revealed protection against neurodegeneration by inhibition of cysteine proteases (cathepsin B), suppression of amyloid- β aggregation and induction of autophagy (Zhong et al., 2013). Low cystatin C level in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease and dementia confirmed this hypothesis. In elderly men (free of dementia at the baseline) low levels of serum cystatin C can precede clinical manifestation of Alzheimer's disease and may be an early marker of future risk of Alzheimer's disease development (Sundelöf et al., 2008). Plasma Cys C levels were significantly correlated with dementia development in Alzheimer's disease and combination (ratio) of elevated cystatin C and decreased HDL concentrations were suggested recently as potential diagnostic value test in differential diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia (Wang et al., 2017).

In the brain, Mathews and Levy (2016) have demonstrated that cystatin C is playing protective roles via several different pathways that depend upon the inhibition of endosomal-lysosomal proteolysis (cysteine proteases inhibition), the induction of cellular autophagy, via the induction of cell proliferation and the inhibition of amyloid- β (A β) aggregation. However,

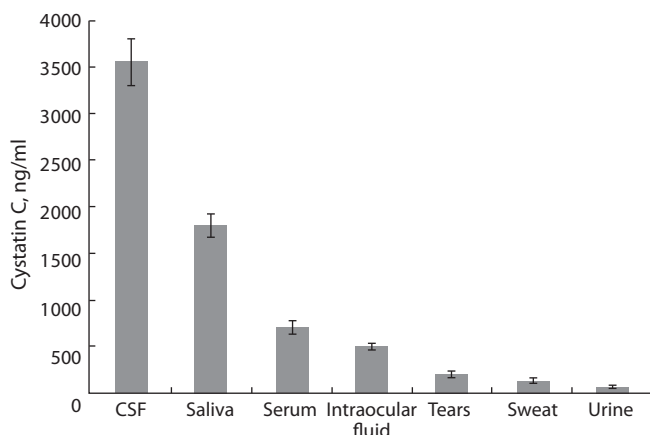


Fig. 1. Distribution of cystatin C in biological fluids of healthy persons, aged 30–50 years old ($M \pm m$), $n = 7–10$ per group.

Samples of CSF (cerebrospinal fluid) were obtained from the Federal Center for Neurosurgery, Novosibirsk, when puncturing patients for a diagnostic purpose that were considered as practically healthy individuals according to the cellular composition of CSF revealed. Cystatin C concentration was measured by Cystatin C Human ELISA kits, BioVendor (Czechia).

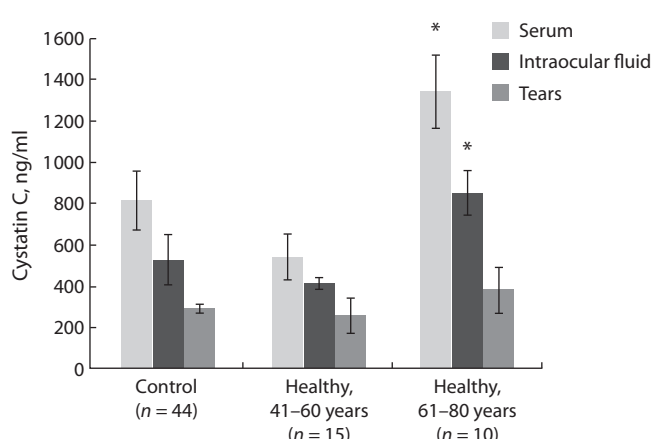


Fig. 2. Concentration of cystatin C (ng/ml) in biological fluids of healthy persons depending on age, $n = 7–10$ per group.

Data are presented as $M \pm m$. * $p < 0.05$ vs. control (group of healthy 20–29 years old individuals) or practically healthy persons of 41–60 years old. Cystatin C concentration was measured by Cystatin C Human ELISA kits, BioVendor (Czechia).

there are opposite points of view of researchers suggesting that brain amyloid- β level depends mainly on a balance between its formation from the amyloid precursor protein (APP) and its removal by proteolysis, with a significant role of several zinc-proteases including neprilysin, the endothelin converting enzymes (ECE-1 and -2), and the insulin-degrading enzyme (Nalivaeva, Turner, 2017). Moreover, cathepsin B, as the most important cysteine protease, might be also anti-amyloidogenic, helping in amyloid- β clearance or, instead, might be involved in amyloid- β production (Zerovnik, 2009).

Parkinson's disease is characterized by a decreased motor activity resulting from the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. α -synuclein, located in presynaptic terminals of neurons, is considered as the main pathogenic protein in Parkinson's disease; another strong pathogenic factor is oxidative stress (Hara et al., 2006; Huang et al., 2015). Dopamine can induce autophagic cell death with upregulation of α -synuclein in human neuroblastoma cells (Gomez-Santos et al., 2003).

An increased serum level of secreted cystatin C was demonstrated during the process of aging (Cuervo, Wong, 2014; Mathews, Levy, 2016) and in various diseases like tumors (Gashenko et al., 2013) or atherosclerosis (Korolenko et al., 2011, 2012, 2015). In biological fluids of healthy persons, the highest concentration of cystatin C in our study was noted in cerebrospinal fluid (CSF), with the following ranking of concentrations: CSF > saliva > serum > intraocular fluid > tear fluid > sweat > urine (Fig. 1).

Results similar to our data concerning cystatin C levels in CSF, saliva, and serum were obtained by other authors (Bjornstad et al., 2015). According to the data that we obtained in practically healthy persons, the concentration of cystatin C is increased in the serum and intraocular fluid of people aged 61–80 years (Fig. 2).

At early stage of Parkinson's disease, increased serum cystatin C was associated with sleep-disordered breathing problems (Xiong et al., 2018). In CSF of patients with amy-

trophic lateral sclerosis cystatin C level was significantly decreased, there was a correlation between cystatin C levels and G73A polymorphism in *CST3* gene encoding cystatin C (Yamamoto-Watanabe et al., 2010). In the brain of patients with Alzheimer's disease cystatin C revealed protective role as a strong endogenous inhibitor of cysteine proteases (cathepsin B), inducer of cellular autophagy related to amyloid-beta aggregation (one of the several pathways of protection) (Mathews, Levy, 2016).

Autophagy is a dynamic cellular process involved in the turnover of proteins, protein complexes, and organelles through lysosomal degradation (Chen, Klionsky, 2011). Autophagy is particularly important in neurons, which do not have a proliferative option for cellular repair (Lee, 2009; Son et al., 2012). Positive and some negative effects (like the "Janus-faced" role) of increased autophagy have been uncovered during development of neurodegeneration (Viscomi, D'Amelio, 2012; Wang, Hiesinger, 2012).

The experimental model of neurodegenerative diseases, autophagy, and cystatin C

A common feature of neurodegenerative diseases is the accumulation of proteins prone to aggregation and protein inclusions, which are, on the one hand, the markers of these diseases and, on the other hand, the cellular tools for combating these diseases; one of the important therapeutic targets in this process is autophagy (Ciechanover, Kwon, 2015; Torra et al., 2018). Autophagy is weakened in various ways in these diseases and decreases with ageing. The removal of the accumulating toxic proteins and structures is carried out by the mechanisms of chaperone-mediated autophagy, macroautophagy, and mitophagy during interactions with the ubiquitin-proteasome system.

Changes in autophagy are involved in the development of various age-dependent degenerative disorders such as neurodegeneration (Tizon et al., 2010b), cancer (Gammoh et al., 2016), tissue atrophy, alcohol neurointoxication (Luo,

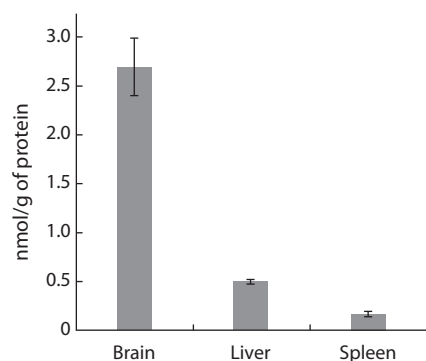


Fig. 3. Cystatin C concentration in different organs in intact C57Bl/6J mice.

Data are presented as $M \pm m$, $n = 7$ per group. Cystatin C assay was performed with ELISA kit for mice (BioVendor, Chechia).

2014) and accelerated aging (Coria et al., 1987; Kovács et al., 2017). Decreased concentration of cystatin C in CSF was reported to have diagnostic significance in neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, which is characterized by progressive motor neuron degeneration (Mathews, Levy, 2016). Low concentration of cystatin C was detected in the serum of patients with Alzheimer's disease, correlating with conversion from mild cognitive disturbances to dementia; in CSF of patients with Alzheimer's disease, the cystatin C level was found to be lower as compared to patients with dementia; therefore, it is possible that changes of cystatin C in CSF may serve as a biomarker of disease (Mathews, Levy, 2016). However, according to some data (Příkrylová Vranová et al., 2010) cystatin C level in CSF of patients with Parkinson's disease was not changed significantly.

Many studies indicate that the weakening of autophagy and/or the incompleteness of protein degradation are important initiators of Parkinson's disease (Wang, Hiesinger, 2012; Maxfield, 2014). *In vitro* studies have revealed that pharmacological induction of autophagy, for instance, by trehalose (Dehay et al., 2010) or by resveratrol (Wu et al., 2013), leads to an improvement in the molecular patterns of Parkinson's disease. In general, it is believed that a decrease in autophagy and in recognition of the segregated material is the key factor of Parkinson's disease, and possibly, activation of autophagy is a good therapeutic strategy against this disease.

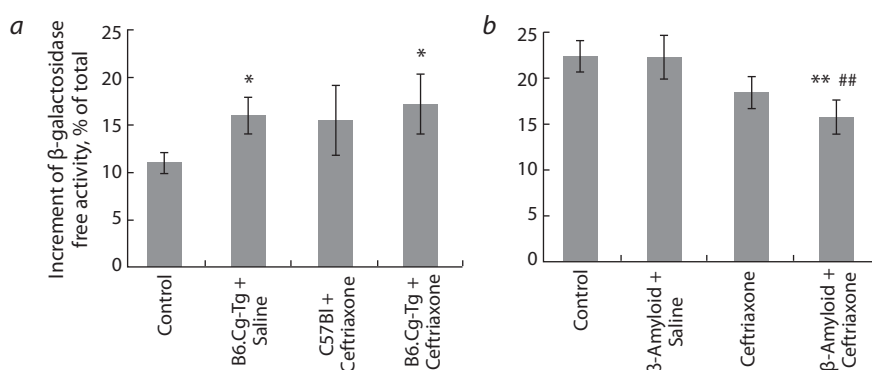


Fig. 4. Autophagy activation in the brain of murine models of Parkinson's (a) and Alzheimer's (b) diseases.

Data are presented as $M \pm m$, $n = 5-6$ per group. Autophagy activation was measured by permeabilization of lysosomal membranes as an increment of free activity of β -galactosidase (in percentage of the total activity of the enzyme) after treatment of brain homogenate in hypotonic media as described in (Pupyshev et al., 2005). Ceftriaxone (100 mg/kg/day for 5 weeks, intraperitoneally) was applied as a neuroprotective treatment since it demonstrated a marked neuroprotective potential at experimental neurodegeneration in the models of Parkinson's and Alzheimer's disease (Weng et al., 2016; Tikhonova et al., 2017).

a, Transgenic 5-month-old mice with overexpression of α -synuclein of B6.Cg-Tg(Pmp-SNCA* $A53T$) 23Mkle/J strain (B6.Cg-Tg) were used as a model of Parkinson's disease (Pupyshev et al., 2018). * $p < 0.05$ vs. Control (mice of wild-type genotype); b, To induce a pharmacological model of Alzheimer's disease, mice of C57Bl/6J strain were administered with an amyloid beta fragment ($A\beta$ 25–35) (Sigma) bilaterally i.c.v. as described earlier (Park et al., 2011; Choi et al., 2013). ** $p < 0.01$ vs. Control (mice with vehicle (sterile water) i.c.v. injections); ## $p < 0.01$ vs. β -amyloid + saline group.

Recently new pharmacological modulators of autophagy with a therapeutic potential were introduced (Galluzzi et al., 2017a, b). Among modulators of autophagy in brain cells for prevention of neurodegeneration (Cheung, Ip, 2011), various authors suggested activators of autophagy, like rapamycin (Malagelada et al., 2010), trehalose, valproate (Harris, Rubinshtein, 2011), and cystatin C (Watanabe et al., 2018).

According to our data obtained in an experimental study, the cystatin C level was significantly higher in the brain than in the liver or spleen of C57Bl/6J untreated mice (Fig. 3), indicating the significant role of this inhibitor in brain tissue.

As demonstrated in our previous study on an experimental murine genetic model of Parkinson's disease, autophagy (according to LC3-II expression) was decreased in the striatum and substantia nigra as compared to other regions of the brain, thus reflecting injury of motor neurons (Pupyshev et al., 2018). This model of Parkinson's disease manifested increased osmotic susceptibility of lysosomes in the brain (according to a release of lysosomal enzyme β -galactosidase) (Fig. 4, a) in conjunction with secondary changes of their membranes as a result of dysfunction of lysosomes and intralysosomal accumulation of toxic material. In a model of Alzheimer's disease, we did not notice the changes in the permeabilization of lysosomal membranes in brain tissue (Fig. 4, b).

Stabilization of lysosomal membrane by a neuroprotector ceftriaxone (see Fig. 4, b) can be related to anti-inflammatory effect of this drug. In the pharmacological model of Alzheimer's disease caused by the central administration of amyloid β in mice, amyloid β toxicity produced an almost 3-fold increase in LC3-II expression (as result of activation of autophagy related to neuroinflammatory process in the frontal cortex) (Fig. 5), and ceftriaxone significantly reduced the rate of autophagy, which apparently reflects the anti-inflammatory effect of ceftriaxone on the cerebral cortex and thereby weakening the autophagic response.

Regulation of autophagy is a complex process, depending on the cell types and diseases, including neurodegeneration (Kiriya, Nochi, 2015; Zou et al., 2017). Current state of knowledge concerning transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy in yeast and mammals were discussed (Feng et al., 2015; Hwang et al., 2017). Novel pharmacological modulators of autophagy were revealed under recent investigations (Ha, Kim, 2016; Gao et al., 2017; Johnston et al., 2017). Several other approaches have been suggested for restoration of autophagy (Martini-Stoica et al., 2016). One of them is introduction of

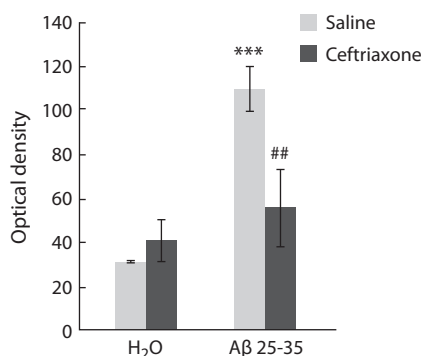


Fig. 5. Effect of ceftriaxone on LC3-II expression in the frontal cortex of C57Bl/6J mice with pharmacological model of Alzheimer's disease.

Data are presented as $M \pm m$, $n = 3-5$ per group. Autophagy activation was measured using immunohistochemical analysis of LC3-II expression as described in (Pupyshev et al., 2018). *** $p < 0.001$ vs. control group (H₂O+saline) of mice treated with vehicle (sterile water, i.c.v.) and intraperitoneal saline injections; ## $p < 0.01$ vs. β -amyloid+saline group.

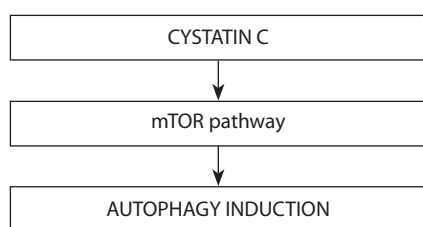


Fig. 6. Possible mechanism of regulation of autophagy in murine primary cortical neurons. The mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cell proliferation, cell motility, cell survival, autophagy (Tizon et al., 2010b; Zou et al., 2017).

AUTEN-99 (autophagy enhancer 99), which activates autophagy in cultured cells and animal models (Kovács et al., 2017). AUTEN-99 possibly can effectively penetrate the blood–brain barrier and somehow protect the progression of neurodegenerative changes in the experiment. Nonetheless, further research is necessary in this direction, especially a study on *in vivo* models of neurodegeneration.

Cystatin C produced by all nucleated cells and has a stable production rate; it is freely filtered by the glomerulus and metabolized after tubular reabsorption (Svechnikova et al., 1998; Bjornstad et al., 2015). Earlier cystatin C knock-out mice were found to be fertile and have no gross pathological abnormality or signs of neurodegeneration up to 6 months of age (Huh et al., 1999). The absence of neurodegeneration in

that study might be attributed to young age of mice (less than 6 m.o.) and strong compensatory mechanisms. Later cystatin C was shown to inhibit amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models (Mi et al., 2007). Moreover, induction of autophagy by cystatin C may be a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines (Lee et al., 2007; Maetzler et al., 2010; Tizon et al., 2010a). In the brain, multiple *in vitro* and *in vivo* findings have demonstrated cystatin C protective roles via pathways that depend upon the inhibition of endosomal-lysosomal pathway cysteine proteases (cathepsin B), via the induction of cellular autophagy, via the induction of cell proliferation, or via the inhibition of amyloid- β (A β) aggregation (Gauthier, Liu, 2016; Mathews, Levy, 2016).

There are some controversial results on the effect of certain drugs on serum cystatin C concentrations in humans for estimation of glomerular filtration rate (GFR) in patients with renal disease. Corticosteroids (prednisolone, repeated administration) can significantly increase serum cystatin C concentration from 1.24 ± 0.40 mg/L at baseline to 1.61 ± 0.80 mg/L at the end of a study period ($p < 0.05$). This finding needs to be considered when interpreting cystatin C levels in patients with heart failure receiving corticosteroid therapy (Zhai et al., 2016).

An additional property of cystatin C (except as a protease inhibitor) that makes this protein clinically relevant is that it can form aggregates by the mechanism known as domain swapping, similar to that involved in the formation of amyloid β plaques in Alzheimer's disease (Xu et al., 2011; Kaminsky, Zhivotovsky, 2012). Secretion of IL-10 in response to inflammatory stimuli downregulates IRF-8 and consequently cystatin C synthesis *in vivo*. The serum concentration of cystatin C decreases in an IL-10-dependent manner in mice treated with the TLR9 agonist CpG (synthetic analog of bacterial DNA, activator of dendrite cells). Cystatin C synthesis is therefore more tightly regulated than hitherto recognized. The mechanisms underlying this regulation may be targeted to alter cystatin C production, with potential therapeutic benefits (Xu et al., 2005, 2011). Transcription factor – IFN regulatory factor 8 (IRF-8) is critical for cystatin C expression in primary dendritic cells. Only the cells with IRF-8 bound to the *CST3* gene promoter express high levels of this inhibitor abundantly. Cystatin C can prevent formation of amyloid β plaques associated with Alzheimer's disease and can itself form toxic aggregates. Cystatin C regulates NO secretion by macrophages and is a TGF- β antagonist.

New approaches to Parkinson's disease treatment

According to data obtained by Chen et al. (2015), Hu et al. (2016), changes in the expression of cystatin C in Parkinson's disease are related to mild cognitive dysfunction. Recently, it was shown that intracerebroventricular administration of cystatin C ameliorates amyotrophic lateral sclerosis-like disturbances in mice (Watanabe et al., 2018). Induction of autophagy by cystatin C was suggested as a potential mechanism of prevention of cerebral vasospasm during several neurological disturbances in an animal experiment (after subarachnoid hemorrhage in mice) (Liu et al., 2013). Possible mechanism of stimulation of autophagy by cystatin C is suggested via the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway (Fig. 6).

It has been found that the injections of cystatin C into the s. nigra of A53T mutant alpha-synuclein transgenic mice revealed neuroprotective effect *in vivo* in Parkinson's disease model with increased autophagy markers LC3B in different brain regions (Zou et al., 2017). Authors concluded, that neuroprotective effect of cystatin C in A53T transgenic mice was related to upregulating the autophagy and VEGF pathways. It presents a new approach to the treatment of Parkinson's disease through neuronal-vascular protection mediated by cystatin C.

Conclusion

The roles of autophagy in the maintenance of cellular survival and in suppression of neurodegeneration have been evaluated in Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases, which are accompanied by the accumulation of amyloid β , α -synuclein, and huntingtin, respectively. Autophagy is down regulated in various ways in these diseases and decreases with ageing. Cystatin C is one of the potent regulators of autophagy. Changes in the expression and secretion of cystatin C in the brain have been shown in amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's and

Parkinson's diseases, and in some animal models of neurodegeneration, thus proving a protective function of cystatin C. It has been suggested that cystatin C plays the primary role in amyloidogenesis. Controlled expression of a cystatin C peptide has been proposed as a new approach to therapy for Alzheimer's disease. Neuroprotective cystatin C effect *in vivo* (in A53T transgenic mice) was connected with upregulation in autophagy and VEGF pathways, opening a new approach to the treatment of Parkinson's disease through neuronal-vascular protection mediated by cystatin C. Administration of cystatin C as a regulator of autophagy holds promise as one possible approach to the treatment of neurodegenerative diseases.

References

- Bjornstad P., Cherney D.Z., Maahs D.M. Update on estimation of kidney function in diabetic kidney disease. *Curr. Diab. Rep.* 2015;15(9):57. DOI 10.1007/s11892-015-0633-2.
- Chen W.W., Cheng X., Zhang X., Zhang Q.S., Sun H.Q., Huang W.J., Xie Z.Y. The expression features of serum cystatin C and homocysteine of Parkinson's disease with mild cognitive dysfunction. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2015;19(16):2957-2963.
- Chen Y., Klionsky D.J. The regulation of autophagy – unanswered questions. *J. Cell Sci.* 2011;124(Pt.2):161-170.
- Cheung Z.H., Ip N.Y. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases – recent advances and future perspectives. *J. Neurochem.* 2011;118(3):317-325. DOI 10.1111/j.1471-4159.2011.07314.x.
- Choi J.Y., Cho E.J., Lee H.S., Lee J.M., Yoon Y.H., Lee S. Tartary buckwheat improves cognition and memory function in an *in vivo* amyloid- β -induced Alzheimer model. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 53:105-111. DOI 10.1016/j.fct.2012.11.002.
- Ciechanover A., Kwon Y.T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* 2015;47:e147.
- Coria F., Castaño E.M., Frangione B. Brain amyloid in normal aging and cerebral amyloid angiopathy is antigenically related to Alzheimer's disease beta-protein. *Am. J. Pathol.* 1987;129(3):422-428.
- Cuervo A.M., Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell. Res.* 2014;24(1):92-104.
- Dehay B., Bove J., Rodriguez-Muela N., Perier C., Recasens A., Boya P., Vila M. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2010;30(37):12535-12544.
- Feng Y., Yao Z., Klionsky D.J. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2015;25(6):354-363. DOI 10.1016/j.tcb.2015.02.002.
- Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M., Cecconi F., Choi A.M., Chu C.T., Codogno P., Colombo M.I., Cuervo A.M., Debnath J., Deretic V., Dikic I., Eskelinen E.L., Fimia G.M., Fulda S., Gewirtz D.A., Green D.R., Hansen M., Harper J.W., Jäättelä M., Johansen T., Juhasz G., Kimmelman A.C., Kraft C., Ktistakis N.T., Kumar S., Levine B., Lopez-Otin C., Madeo F., Martens S., Martinez J., Melendez A., Mizushima N., Münz C., Murphy L.O., Penninger J.M., Piacentini M., Reggiori F., Rubinstein D.C., Ryan K.M., Santambrogio L., Scorrano L., Simon A.K., Simon H.U., Simonsen A., Tavernarakis N., Tooze S.A., Yoshimori T., Yuan J., Yue Z., Zhong Q., Kroemer G. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017a;36(13):1811-1836. DOI 10.15252/embj.201796697.
- Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Levine B., Green D.R., Kroemer G. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017b;6(7):487-511. DOI 10.1038/nrd.2017.22.
- Gammoh N., Fraser J., Puente C., Syred H.M., Kang H., Ozawa T., Lam D., Acosta J.C., Finch A.J., Holland E., Jiang X. Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. *Autophagy.* 2016;12(9):1431-1439. DOI 10.1080/15548627.2016.1190053.
- Gao L., Jauregui C.E., Teng Y. Targeting autophagy as a strategy for drug discovery and therapeutic modulation. *Future Med. Chem.* 2017;9(3):335-345. DOI 10.4155/fmc-2016-0210.
- Gashenko E.A., Lebedeva V.A., Brak I.V., Tsykalenko E.A., Vinokurova G.V., Korolenko T.A. Evaluation of serum procathepsin B, cystatin B and cystatin C as possible biomarkers of ovarian cancer. *Int. J. Circumpolar Health.* 2013;72:21215. DOI 10.3402/ijch.v72i0.21215.
- Gauthier A.C., Liu J. Neurodegeneration and neuroprotection in glaucoma. *Yale J. Biol. Med.* 2016;89(1):73-79.
- Gauthier S., Kaur G., Mi W., Tizon B., Levy E. Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases. *Front. Biosci. (Schol Ed).* 2011;3:541-554.
- Gomez-Santos C., Ferrer I., Santidrian A.F., Barrachina M., Gil J., Ambrosio S. Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* 2003;73:341-350.
- Ha J., Kim J. Novel pharmacological modulators of autophagy: an updated patent review (2012–2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2016; 26(11):1273-1289.
- Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006;441:885-889.
- Harris H., Rubinstein D.C. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2011;8(2):108-117. DOI 10.1038/nrneurol.2011.200.
- Hu W.D., Chen J., Mao C.J., Feng P., Yang Y.P., Luo W.F., Liu C.F. Elevated cystatin C levels are associated with cognitive impairment and progression of Parkinson disease. *Cogn. Behav. Neurol.* 2016;29(3):144-149. DOI 10.1097/WNN.0000000000000100.
- Huang C.K., Chang Y.T., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A., Lin C.L., Hung C.S., Lai T.J., Ho Y.J. Synergistic effects of ceftriaxone and erythropoietin on neuronal and behavioral deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson's disease dementia. *Behav. Brain Res.* 2015;294:198-207. DOI 10.1016/j.bbr.2015.08.011.
- Huh C.G., Håkansson K., Nathanson C.M., Thorgeirsson U.P., Jonsson N., Grubb A., Abrahamson M., Karlsson S. Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol. Pathol.* 1999;52(6):332-340.
- Hwang H.Y., Cho S.M., Kwon H.J. Approaches for discovering novel bioactive small molecules targeting autophagy. *Expert Opin. Drug Discov.* 2017;12(9):909-923. DOI 10.1080/17460441.2017.1349751.
- Johnston T.P., Korolenko T.A., Bgatova N.P. Statins and Yeast Polysaccharides in the Treatment of Hyperlipidemia and Liver Steatosis, Role of Autophagy. In: Berhardt L.V. (Ed.). *Advances in Medicine and Biology*. Vol. 110. New York: Nova Science Publ., 2017;31-60.
- Kaminsky V., Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1824(1):44-50.
- Kaur G., Levy E. Cystatin C in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 2012;6(5):79. DOI 10.3389/fnmol.2012.00079.
- Keppeler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett.* 2006;235(2):159-176.
- Kiriyama Y., Nochi H. The function of autophagy in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(11):26797-26812. DOI 10.3390/ijms161125990.
- Korolenko T.A., Cherkanova M.S., Gashenko E.A., Johnston T.P., Bravve I.Yu. Cystatin C, Atherosclerosis and Lipid-Lowering Therapy by Statins. In: Cohen J.B., Ryseck L.P. (Eds.). *Cystatins, Protease Inhibitors, Biomarkers and Immunomodulators*. Nova Science Publ., USA, 2011;187-204.
- Korolenko T.A., Pisareva E.E., Filyushina E.E., Johnston T.P., Machova E. Serum cystatin C and chitotriosidase in acute P-407 induced dyslipidemia: can they serve as potential early biomarkers for atherosclerosis? *Exp. Toxicol. Pathol.* 2015;67(9):459-466. DOI 10.1016/j.etp.2015.06.003.

- Korolenko T.A., Tuzikov F.V., Cherkanova M.S., Johnston T.P., Tuzikova N.A., Loginova V.M., Filjushina E.E., Kaledin V.I. Influence of atorvastatin and carboxymethylated glucan on the serum lipoprotein profile and MMP activity of mice with lipemia induced by poloxamer 407. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012;90(2):141-153. DOI 10.1139/y11-118.
- Kovács T., Billes V., Komlós M., Hotzi B., Manžéger A., Tarnóci A., Papp D., Szikszai F., Szinyákovich J., Rác Á., Noszá B., Veszéka S., Walter F.R., Deli M.A., Hackler L., Jr, Alfoldi R., Huzian O., Puskas L.G., Liliom H., Tárnok K., Schlett K., Borsy A., Welker E., Kovács A.L., Pádár Z., Erdős A., Legradi A., Bjelík A., Gulya K., Gulyás B., Vellai T. The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *Sci. Rep.* 2017;7:42014. DOI 10.1038/srep42014.
- Lee D.C., Womble T.A., Mason C.W., Jackson I.M., Lamango N.S., Severs W.B., Palm D.E. 6-Hydroxydopamine induces cystatin C-mediated cysteine protease suppression and cathepsin D activation. *Neurochem. Int.* 2007;50(4):607-618.
- Lee J.A. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. *BMB Rep.* 2009;42(6):324-330.
- Li W., Sultana N., Siraj N., Ward L.J., Pawlik M., Levy E., Jovinge S., Bengtsson E., Yuan X.-M. Autophagy dysfunction and regulatory cystatin C in macrophage death of atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2016;20(9):1664-1672.
- Ling D., Salvaterra P.M. A central role for autophagy in Alzheimer-type neurodegeneration. *Autophagy.* 2009;5(5):738-740.
- Liu Y., Cai H., Wang Z., Li J., Wang K., Yu Z., Chen G. Induction of autophagy by cystatin C: a potential mechanism for prevention of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur. J. Med. Res.* 2013;18:21. DOI 10.1186/2047-783X-18-21.
- Luo J. Autophagy and ethanol neurotoxicity. *Autophagy.* 2014;10(12):2099-2108. DOI 10.4161/15548627.2014.981916.
- Maetzel W., Schmid B., Synofzik M., Schulte C., Riester K., Huber H., Brockmann K., Gasser T., Berg D., Melms A. The CST3 BB genotype and low cystatin C cerebrospinal fluid levels are associated with dementia in Lewy body disease. *J. Alzheimers Dis.* 2010;19(3):937-942. DOI 10.3233/JAD-2010-1289.
- Malagelada C., Jin Z.H., Jackson-Lewis V., Przedborski S., Greene L.A. Rapamycin protects against neuron death in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2010;30(3):1166-1175. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3944-09.2010.
- Martini-Stoica H., Xu Y., Ballabio A., Zheng H. The autophagy-lysosomal pathway in neurodegeneration: a TFEB perspective. *Trends Neurosci.* 2016;39(4):221-234. DOI 10.1016/j.tins.2016.02.002.
- Mathews P.M., Levy E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 2016;32:38-50. DOI 10.1016/j.arr.2016.06.003.
- Maxfield F. Role of endosomes and lysosomes in human disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6(5):a016931. DOI 10.1101/cshperspect.a016931.
- Mi W., Pawlik M., Sastre M., Jung S.S., Radvinsky D.S., Klein A.M., Sommer J., Schmidt S.D., Nixon R.A., Mathews P.M., Levy E. Cystatin C inhibits amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models. *Nat. Genet.* 2007;39(12):1440-1442.
- Nalivaeva N.N., Turner A.J. Role of ageing and oxidative stress in regulation of amyloid-degrading enzymes and development of neurodegeneration. *Curr. Aging Sci.* 2017;10(1):32-40.
- Park S.H., Kim J.H., Bae S.S., Hong K.W., Lee D.S., Leem J.Y., Choi B.T., Shin H.K. Protective effect of the phosphodiesterase III inhibitor cilostazol on amyloid β -induced cognitive deficits associated with decreased amyloid β accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;408(4):602-608. DOI 10.1016/j.bbrc.2011.04.068.
- Poteryaeva O.N., Falameyeva O.V., Korolenko T.A., Kaledin V.I., Djanayeva S.J., Nowicky J.W., Sandula J. Cysteine proteinase inhibitor level in tumor and normal tissues in control and cured mice. *Drugs Exp. Clin. Res.* 2000;26(5-6):301-306.
- Přikrylová Vranová H., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D., Zapletalová J., Hlušík P., Kaňovský P. CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. (Vienna).* 2010;117(10):1177-1181. DOI 10.1007/s00702-010-0462-z.
- Pupyshev A.B., Gutina E.M., Fedina R.G., Michurina S.V., Shurlygina A.V., Verbitskaya L.V. Effect of benz(a)pyrene and constant light exposure on rat liver lysosomes and biliary excretion of lysosomal enzymes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005;139(1):34-37.
- Pupyshev A.B., Korolenko T.A., Akopyan A.A., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant α -synuclein as an early event at synucleinopathy progression. *Neurosci. Lett.* 2018;672:140-144. DOI 10.1016/j.neulet.2017.12.001.
- Son J.H., Shim J.H., Kim K.-H., Ha J.-Y., Han J.Y. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp. Molec. Med.* 2012;44(2):89-98.
- Stoka V., Turk B., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life.* 2005;57(4-5):347-353.
- Sundelöf J., Arnlöv J., Ingelsson E., Sundström J., Basu S., Zethelius B., Larsson A., Irizarry M.C., Giedraitis V., Rönnemaa E., Degerman-Gunnarsson M., Hyman B.T., Basun H., Kilander L., Lannfelt L. Serum cystatin C and the risk of Alzheimer disease in elderly men. *Neurology.* 2008;71(14):1072-1079. DOI 10.1212/01.wnl.0000326894.40353.93.
- Svechnikova I.G., Korolenko T.A., Stashko Ju.F., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Nowicky J.W. The influence of Ukrain on the growth of HA-1 tumor in mice: the role of cysteine proteinases as markers of tumor malignancy. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1998;24(5-6):261-269.
- Tikhonova M.A., Ho S.C., Akopyan A.A., Kolosova N.G., Weng J.C., Meng W.Y., Lin C.L., Amstislavskaya T.G., Ho Y.J. Neuroprotective effects of ceftriaxone treatment on cognitive and neuronal deficits in a rat model of accelerated senescence. *Behav. Brain Res.* 2017;330:8-16. DOI 10.1016/j.bbr.2017.05.002.
- Tizon B., Ribe E.M., Mi W., Troy C.M., Levy E. Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity. *J. Alzheimers Dis.* 2010a;19(3):885-894. DOI 10.3233/JAD-2010-1291.
- Tizon B., Sahoo S., Yu H., Gauthier S., Kumar A.R., Mohan P., Figliola M., Pawlik M., Grubb A., Uchiyama Y., Bandyopadhyay U., Cuervo A.M., Nixon R.A., Levy E. Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. *PLoS One.* 2010b;5(3):e9819. DOI 10.1371/journal.pone.0009819.
- Torra A., Parent A., Cuadros T., Rodríguez-Galván B., Ruiz-Bronchal E., Ballabio A., Bortolozzi A., Vila M., Bové J. Overexpression of TFEB drives a pleiotropic neurotrophic effect and prevents Parkinson's disease-related neurodegeneration. *Mol. Ther.* 2018;26(6):1552-1567. DOI 10.1016/j.ymthe.2018.02.022.
- Viscomi M.T., D'Amelio M. The "Janus-faced role" of autophagy in neuronal sickness: focus on neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 2012;46(2):513-521. DOI 10.1007/s12035-012-8296-3.
- Wang D., Hiesinger P.R. Autophagy, neuron-specific degradation and neurodegeneration. *Autophagy.* 2012;8(4):711-713. DOI 10.4161/auto.19660.
- Wang R., Chen Z., Fu Y., Wei X., Liao J., Liu X., He B., Xu Y., Zou J., Yang X., Weng R., Tan S., McElroy C., Jin K., Wang Q. Plasma cystatin C and high-density lipoprotein are important biomarkers of Alzheimer's disease and vascular dementia: a cross-sectional study. *Front. Aging Neurosci.* 2017;9:26. DOI 10.3389/fnagi.2017.00026.
- Watanabe S., Komine O., Endo F., Wakasugi K., Yamanaka K. Intracerebroventricular administration of Cystatin C ameliorates disease in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Neurochem.* 2018;145(1):80-89. DOI 10.1111/jnc.14285.
- Weng J.C., Tikhonova M.A., Chen J.H., Shen M.S., Meng W.Y., Chang Y.T., Chen K.H., Liang K.C., Hung C.S., Amstislavskaya T.G., Ho Y.J. Ceftriaxone prevents the neurodegeneration and decreased neurogenesis seen in a Parkinson's disease rat model: an immunohistochemical and MRI study. *Behav. Brain Res.* 2016;305:126-139. DOI 10.1016/j.bbr.2016.02.034.

- Wu C.F., Yang J.Y., Wang F., Wang X.-X. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chin. J. Nat. Med.* 2013; 11(1):1-15.
- Xiong K.P., Dai Y.P., Chen J., Xu J.M., Wang Y., Feng P., You S.J., Liu C.F. Increased serum cystatin C in early Parkinson's disease with objective sleep disturbances. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2018;131(8):907-911. DOI 10.4103/0366-6999.229902.
- Xu L., Sheng J., Tang Z., Wu X., Yu Y., Guo H., Shen Y., Zhou C., Paraoan L., Zhou J. Cystatin C prevents degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: in vitro and in vivo studies. *Neurobiol. Dis.* 2005;18:152-165.
- Xu Y., Ding Y., Li X., Wu X. Cystatin C is a disease-associated protein subject to multiple regulation. *Immunol. Cell Biol.* 2015;93(5):442-451. DOI 10.1038/icb.2014.121.
- Xu Y., Schnorrer P., Proietto A., Kowalski G., Febbraio M.A., Acha-Orbea H., Dickins R.A., Villadangos J.A. IL-10 controls cystatin C synthesis and blood concentration in response to inflammation through regulation of IFN regulatory factor 8 expression. *J. Immunol.* 2011;186(6):3666-3673. DOI 10.4049/jimmunol.1001934.
- Yamamoto-Watanabe Y., Watanabe M., Jackson M., Akimoto H., Sugimoto K., Yasujima M., Wakasaya Y., Matsubara E., Kawarabayashi T., Harigaya Y., Lyndon A.R., Shoji M. Quantification of cystatin C in cerebrospinal fluid from various neurological disorders and correlation with G73A polymorphism in CST3. *Brain Res.* 2010;1361:140-145. DOI 10.1016/j.brainres.2010.09.033.
- Zerovnik E. The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *Bioessays*. 2009;31(6):597-599. DOI 10.1002/bies.200900012.
- Zhai J.L., Ge N., Zhen Y., Zhao Q., Liu C. Corticosteroids significantly increase serum cystatin C concentration without affecting renal function in symptomatic heart failure. *Clin. Lab.* 2016;62(1-2):203-207.
- Zhong X.M., Hou L., Luo X.N., Shi H.S., Hu G.Y., He H.B., Chen X.R., Zheng D., Zhang Y.F., Tan Y., Liu X.J., Mu N., Chen J.P., Ning Y.P. Alterations of CSF cystatin C levels and their correlations with CSF A β 40 and A β 42 levels in patients with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and the atrophic form of general paresis. *PLoS One*. 2013;8(1):e55328. DOI 10.1371/journal.pone.0055328.
- Zou J., Chen Z., Wei X., Chen Z., Fu Y., Yang X., Chen D., Wang R., Jenner P., Lu J.H., Li M., Zhang Z., Tang B., Jin K., Wang Q. Cystatin C as a potential therapeutic mediator against Parkinson's disease via VEGF-induced angiogenesis and enhanced neuronal autophagy in neurovascular units. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2854. DOI 10.1038/cddis.2017.240.

ORCID ID

E.L. Zavjalov orcid.org/0000-0002-9412-3874

Acknowledgements. This work was supported partially by grant No. 16-04-01423-a from the Russian Foundation for Basic Research (Russia), to T.A.K., budget from the project No. 0538-2014-0009 of the Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine (SRIPhBM) and a unique scientific resource "Biological collection – Genetic biomodels of neuro-psychiatric disorders" (No. 493387) at the SRIPhBM. The studies were implemented using the equipment of the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at ICG SB RAS, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (unique identifier of the project: RFMEFI62117X0015). The English language was corrected and certified by shevchuk-editing.com.

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

Received September 24, 2018. Revised February 11, 2019. Accepted February 11, 2019.

Изучение иммуногенности рекомбинантного фрагмента ортопоксвирусного белка p35

Я.А. Хлусевич¹, А.А. Матвеев^{1, 2}, Е.П. Гончарова¹, И.К. Байков¹, Н.В. Тикунова^{1, 2} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Несмотря на ликвидацию натуральной оспы, ортопоксвирусы продолжают оставаться источником биологической опасности для людей, так как в природе циркулируют вирусы оспы коров и оспы обезьян, причем последний способен вызывать не только спорадические случаи заболеваний человека, но и вспышки оспоподобной инфекции. Кроме того, периодическая вакцинация необходима для представителей определенных профессий (ученые, изучающие патогенные ортопоксвирусы, медицинские работники и др.). Ослопрививание – вакцинация живым вирусом осповакцины, которое широко использовалось при ликвидации натуральной оспы, обеспечивает формирование у вакцинированных людей длительного иммунитета. Однако, давая достаточно надежную защиту, ослопрививание нередко сопровождается серьезными поствакцинальными осложнениями, вероятность возникновения которых особенно велика для лиц со сниженным иммунным статусом. В связи с этим разработка препаратов для профилактики и лечения инфекций, вызванных ортопоксвирусами, актуальна и в настоящее время. Цель данного исследования – оценка иммуногенности в мышинной модели рекомбинантного белка p35Δ12, сконструированного на основе белка p35 вируса оспы коров. Ранее было показано, что белок p35Δ12 связывается с высоким сродством с полноразмерным вируснейтрализующим анти-ортопоксвирусным антителом человека. В настоящей работе рекомбинантный белок p35Δ12, нарабатанный в клетках *E. coli* XL1-blue и очищенный хроматографически, использовали для двукратной иммунизации мышей. Через две недели после второй иммунизации у мышей брали образцы крови и анализировали находящиеся в сыворотке антитела. Методами иммуноферментного и вестерн-блот анализа было показано, что сыворотки иммунизированных животных содержали антитела класса IgG, направленные к рекомбинантному белку p35Δ12. Методом конфокальной микроскопии показано, что антитела, индуцированные белком p35Δ12, способны узнавать клетки Vero E6, зараженные вирусом осповакцины ЛИВП-GFP. Кроме того, находящиеся в сыворотках иммунизированных мышей антитела могут нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины ЛИВП-GFP в реакции ингибирования бляшкообразования *in vitro*.
Ключевые слова: белок p35 ортопоксвирусов; вирус оспы коров; рекомбинантный белок; иммунизация; конфокальная микроскопия.

Для цитирования: Хлусевич Я.А., Матвеев А.А., Гончарова Е.П., Байков И.К., Тикунова Н.В. Изучение иммуногенности рекомбинантного фрагмента ортопоксвирусного белка p35. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):398-404. DOI 10.18699/VJ19.508

Immunogenicity of recombinant fragment of orthopoxvirus p35 protein in mice

Ya.A. Khlusevich¹, A.L. Matveev^{1, 2}, E.P. Goncharova¹, I.K. Baykov¹, N.V. Tikunova^{1, 2} 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Despite the elimination of smallpox, orthopoxviruses continue to be a source of biological danger for humans, as cowpox and monkey pox viruses circulate in nature and the last virus can cause both sporadic cases of human diseases and outbreaks of smallpox-like infection. In addition, periodic vaccination is necessary for representatives of some professions (scientists studying pathogenic orthopoxviruses, medical personnel, etc.). Vaccination against smallpox virus with live vaccinia virus, which was widely used during the elimination of smallpox, induces the formation of long-term immunity in vaccinated people. However, providing a high level of protection, the vaccination is often accompanied by serious post-vaccination complications, the probability of which is particularly great for individuals with compromised immunity. In this regard, the development of preparations for the prevention and treatment of infections caused by orthopoxviruses remains important today. The aim of this study was to assess the immunogenicity in the mouse model of recombinant protein p35Δ12, designed previously on the base of the cowpox virus protein p35. It was previously shown that the

protein p35Δ12 was recognized by fully human neutralizing anti-orthopoxviral antibody with high affinity. In this work, recombinant protein p35Δ12 produced in *E. coli* cells XL1-blue and purified by chromatography was used for two-time immunization of mice. Two weeks after the second immunization, blood samples were taken from mice and serum antibodies were analyzed. It was shown by ELISA and Western-blot analysis that immunized mice sera contained IgG antibodies specific to recombinant protein p35Δ12. Confocal microscopy showed that antibodies induced by the p35Δ12 protein were able to recognize Vero E6 cells infected with the LVP-GFP vaccinia virus. In addition, the antibodies in the serum of immunized mice were able to neutralize the infectivity of the vaccinia virus LVP-GFP in the plaque reduction neutralization test *in vitro*. These experiments have demonstrated promising properties of the p35Δ12 protein if it were used as a component of vaccine for prophylaxis of orthopoxvirus infections.

Key words: p35 orthopoxvirus protein; cowpox virus; recombinant protein; immunization; confocal microscopy.

For citation: Khlusevich Ya.A., Matveev A.L., Goncharova E.P., Baykov I.K., Tikunova N.V. Immunogenicity of recombinant fragment of orthopoxvirus p35 protein in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(4):398-404. DOI 10.18699/VJ19.508 (in Russian)

Введение

Представители рода *Orthopoxvirus* (семейство *Poxviridae*) – это сложные ДНК-содержащие вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме зараженных клеток и имеющие свои собственные механизмы регуляции репликации и транскрипции (Shchelkunov et al., 2005; Moss, 2013). Ортопоксвирусы различаются по спектру хозяйской специфичности: существуют вирусы с широкой хозяйской специфичностью – вирус оспы коров (ВОК), вирус оспы обезьян (ВОО); есть вирусы, способные заражать только одного хозяина – вирус экстремелии (ВЭ), вирус натуральной оспы (ВНО) (Buller et al., 1986; Shchelkunov et al., 2005). Несколько представителей этого рода являются патогенными для человека; ВНО и ВОО могут вызвать генерализованное заболевание (Jezek et al., 1986; MacNeil et al., 2009; Smith, 2013; McCollum, Damon, 2014; Nakazawa et al., 2015), тогда как инфекция вирусом осповакцины (ВОВ) или ВОК обычно приводит лишь к локальному повреждению кожи (Moss, 2013).

Несмотря на то что естественная трансмиссия ВНО была прекращена, ортопоксвирусы продолжают оставаться источником биологической опасности для людей, так как в природе циркулируют ортопоксвирусы, способные инфицировать человека. Так, ВОО может вызывать как спорадические случаи оспоподобного заболевания человека, так и вспышки этой инфекции (Di Giulio, Eckburg, 2004; Rimoin et al., 2010; Reynolds et al., 2013). Кроме того, постоянно регистрируются случаи заболеваний людей оспой коров и вакциноподобным заболеванием (Zafar et al., 2007; Campe et al., 2009; Carletti et al., 2009; Ninove et al., 2009; Silva-Fernandes et al., 2009; Trindade et al., 2009; Bhanuprakash et al., 2010; Ducournau et al., 2013; Riyesh et al., 2014; Hobi et al., 2015; Kinnunen et al., 2015). Однако в связи с ликвидацией натуральной оспы массовое оспопрививание (вакцинация живым ВОВ) было прекращено во второй половине 1970-х гг., и в настоящее время большинство населения не имеет иммунитета к ортопоксвирусным инфекциям. Прививка живым ВОВ приводит к формированию у вакцинированных людей длительного иммунитета (Crotty et al., 2003). Вместе с тем, давая достаточно надежную защиту, оспопрививание нередко сопровождается серьезными поствакцинальными осложнениями, вероятности возникновения которых особенно велика для лиц со сниженным иммунным статусом (Fulginiti et al., 2003; Kawakami et al., 2009). В связи

с этим не прекращаются разработки препаратов для профилактики и лечения инфекций, вызванных ортопоксвирусами.

С появлением рекомбинантных технологий возникло новое направление в вакцинологии – применение отдельных антигенов вместо целых патогенов. Такой подход позволяет сфокусировать иммунный ответ на более значимых мишенях. Предполагается, что иммунизация определенным рекомбинантным белком, несущим наиболее иммуногенные эпитопы, могла бы индуцировать наработку эффективных антител, как при классической вакцинации. Действительно, субъединичные вакцины в настоящее время активно разрабатываются и уже используются в практике (Bazzill et al., 2018; Medina et al., 2018; Shi et al., 2018; Wang et al., 2018).

Ранее для исследования эпитопной специфичности анти-ортопоксвирусного полноразмерного антитела человека fh1A, способного нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины, был сконструирован рекомбинантный белок p35Δ12 (Khlusevich et al., 2018), представляющий фрагмент белка p35 вируса оспы коров. Характер взаимодействия вируснейтрализующего антитела с белком p35Δ12 позволил предположить наличие вируснейтрализующего эпитопа в последовательности этого рекомбинантного белка. Цель данного исследования – оценка способности белка p35Δ12 индуцировать образование вируснейтрализующих антител у мышей.

Материалы и методы

Рекомбинантный белок p35Δ12, сконструированный ранее (Khlusevich et al., 2018), нарабатывали в клетках *Escherichia coli* XL1-blue, трансформированных плазмидой pQE30-Δ12 и индуцированных 0.2 мМ изопропил тиогалактозидом (ИПТГ). Белок p35Δ12 очищали из цитоплазмы трансформированных клеток с помощью аффинной хроматографии с использованием носителя Ni-NTA Sepharose. Мономерную фракцию белка отделяли хроматографически на колонке с носителем Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Очищенный белок p35Δ12 концентрировали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР, 100 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4) с использованием фильтров Amicon Ultra-4 10K (Millipore).

Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по защите животных, используемых в научных целях (Директива EU2010/63/EU). Все экспе-

рименты с животными были одобрены комитетом по биоэтике Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия. Мышей размещали в пластиковых клетках при нормальном цикле день/ночь. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*.

Для иммунизации использовали самок мышей BALB/c возраста 5–6 недель, приобретенных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (р.п. Кольцово, Россия). Очищенный белок p35Δ12 разводили в ФСБР и вводили интраперитонеально в дозировке 10 мкг на мышь одновременно с полным адъювантом Фрейнда (Sigma, США), общий объем инъекции – 500 мкл. Через 2 недели иммунизацию повторяли, заменив полный адъювант Фрейнда неполным адъювантом (Sigma). Через 14 дней после второй иммунизации собирали кровь из лицевой вены.

Сыворотку выделяли из свернувшихся образцов крови центрифугированием, после чего образцы сыворотки инкубировали 30 мин при 56 °C для инактивации белков комплемента. Эффективность иммунизации оценивали иммуноферментным анализом (ИФА) и вестерн-блот анализом.

Для выявления анти-p35Δ12 антител в сыворотках иммунизированных мышей в лунки 96-луночного полистиролового планшета («Медполимер», Россия) сорбировали белок p35Δ12 в ФСБР, 200 нг/лунку. После удаления не связавшегося антигена лунки промывали ФСБР, участки неспецифического связывания блокировали 5 % раствором обезжиренного молока в ФСБР в течение 1 ч, после чего лунки снова промывали ФСБР с 0.1 % Tween 20. Затем в лунки вносили последовательные разведения сывороток мышей в ФСБР, начиная с разведения 1:200, с шагом разведения 1:2. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °C. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли конъюгатом поликлональных антител козы против IgG (H+L) мыши со щелочной фосфатазой (Sigma) в разведении 1:8000. Затем лунки последовательно промывали ФСБР с 0.2 % Tween 20 и АР-буфером (100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ Трис-HCl, pH 9.5); иммунные комплексы окрашивали пара-нитрофенилфосфатом в АР-буфере.

Для проведения вестерн-блот анализа лизат клеток *E. coli*, продуцирующих белок p35Δ12, фракционировали электрофоретически в 12.5 % полиакриламидном геле с 0.1 % додецилсульфатом натрия и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma), которую после блокирования сайтов неспецифического связывания 5 % раствором обезжиренного молока в ФСБР инкубировали с мышиными сыворотками, разведенными 1:200 в ФСБР с 0.1 % Tween 20. Связавшиеся антитела выявляли конъюгатом поликлональных антител козы против IgG (H+L) мыши со щелочной фосфатазой (Sigma) в разведении 1:8000. Визуализацию иммунного комплекса проводили, добавляя 5-бromo-3-индолил фосфат и нитро-тетразолиевый голубой. В качестве положительного контроля использовали полноразмерное антитело человека fh1A, специфичное к белку p35 ортопоксвирусов (Khlusevich et al., 2018), которое инкубировали аналогично мышиным сывороткам, но выявляли с помощью поликлональных антител козы против IgG (H+L) человека (Sigma).

В экспериментах по оценке взаимодействия сывороток мышей с жизнеспособными вирионами ВОВ использовали штамм ЛИВП-GFP, в котором ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), встроен в состав гена тимидинкиназы (Петров и др., 2013).

Для проведения лазерно-сканирующей микроскопии суспензию ВОВ (280 БОЕ), штамм ЛИВП-GFP (Петров и др., 2013), разведенную в 100 мкл питательной среды DMEM с 2 % эмбриональной сывороткой, добавляли к монослою клеток Vero E6, выращенных в 35 мм чашках Петри для микроскопии (Ibidi, Германия), и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Затем клетки три раза отмывали питательной средой. Через 2 дня зараженные клетки фиксировали 10 % раствором формалина, промывали ФСБР и блокировали 3 % бычьим сывороточным альбумином 1 ч при 37 °C. Далее к фиксированным клеткам добавляли сыворотки иммунизированных мышей в ФСБР в разведении 1:200 и инкубировали 1 ч при 37 °C. После промывания клеток стерильным ФСБР связавшиеся антитела выявляли поликлональными антителами козы против IgG (H+L) мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633. Через час инкубации клетки промывали стерильным ФСБР и добавляли 300 нМ раствор DAPI (Life Technologies, США) в ФСБР для окрашивания клеточных ядер. В качестве отрицательного контроля использовали нормальную мышиную сыворотку.

В качестве положительного контроля использовали полноразмерное анти-p35 антитело человека fh1A (Khlusevich et al., 2018), которое инкубировали аналогично мышиным сывороткам, но выявляли с помощью поликлональных антител козы против IgG (H+L) человека, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633.

Изображения специфического взаимодействия антител с клетками, зараженными ВОВ ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с 20-кратным объективом. Флуоресцентные метки DAPI, GFP и Alexa Fluor 633 возбуждали на длинах волн 405, 488 и 633 нм соответственно; эмиссию детектировали на длинах волн 440–480, 490–530 и 630–700 нм соответственно. Получение и обработку изображений выполняли в пакете программ ZEN black edition (Carl Zeiss).

Для оценки вируснейтрализующей активности сывороток мышей, иммунизированных очищенным белком p35Δ12, суспензию ВОВ, штамм ЛИВП-GFP (Петров и др., 2013), разведенную в питательной среде DMEM с 2 % сывороткой телят, смешивали в равном объеме с различными разведениями мышиных сывороток и инкубировали 1 ч при 37 °C. После этого смесь насливали на монослой клеток Vero E6 в 24-луночных культуральных планшетах (TPP, Швейцария). Через 2 ч смесь удаляли, клетки промывали средой DMEM и культивировали в питательной среде DMEM с 2 % сывороткой телят при 37 °C. В контрольные лунки вносили суспензию вируса без добавления мышиной сыворотки. Через несколько дней клетки окрашивали 0.1 % кристаллическим фиолетовым в 10 % растворе формальдегида и подсчитывали бляшки. Уровень нейтрализации рассчитывали по формуле $N = (V_0 - V_n) / V_0 \times 100 \%$, где V_0 – среднее количество бляшек в контрольных лунках, а V_n – количество бляшек в экспериментальных лунках.

Результаты

Рекомбинантный белок р35Δ12, нарабатанный в клетках *E. coli* XL1-blue, очищали из фракции растворимых цитоплазматических белков (рис. 1, а). При очистке целевого белка с помощью аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA сефарозы вместе с белком р35Δ12 с молекулярной массой около 30 кДа соочищался клеточный белок с молекулярной массой около 25 кДа (см. рис. 1, а). Вестерн-блот анализ очищенного белка р35Δ12 подтвердил его способность взаимодействовать с полноразмерным антителом человека fh1A, направленным к ортопоксвирусному белку р35; дополнительный белок с молекулярной массой около 25 кДа антителом fh1A не выявлялся (см. рис. 1, б).

Очищенный белок р35Δ12 использовали для иммунизации мышей BALB/с. Иммунизацию проводили по так называемой короткой схеме: белок вводили дважды в дозировке 10 мкг на мышь с интервалом в 2 недели. Из образцов крови, собранных через 7 дней после второй иммунизации, отделили сыворотку и оценили наличие в ней антител против белка р35Δ12. Данные ИФА подтвердили наличие специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей (рис. 2). Кроме того, эти сыворотки выявляли белок р35Δ12, перенесенный на нитроцеллюлозную мембрану, в вестерн-блот анализе (см. рис. 1, б).

Для визуализации взаимодействия находящихся в сыворотках иммунизированных мышей анти-р35Δ12 антител с клетками, зараженными ортопоксвирусом, использовали лазерно-сканирующую микроскопию. В экспериментах применяли сконструированный ранее BOB, штамм ЛИВП-GFP (Петров и др., 2013), при размножении которого в цитоплазме зараженных клеток накапливается белок GFP и клетки окрашиваются в зеленый цвет при возбуждении светом с длиной волны 488 нм и детекции в диапазоне длин волн 490–530 нм. Клетки Vero E6 заражали BOB ЛИВП-GFP и обрабатывали сыворотками иммунизированных мышей и нормальной мышиной сывороткой (отрицательный контроль). Мышинные антитела выявляли конъюгатом антивидовых антител с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633. Этот флуорофор возбуждается светом с длиной волны 633 нм, и объекты, меченные Alexa Fluor 633, окрашиваются красным цветом при детекции в световой области 630–700 нм.

Результаты конфокальной микроскопии, представленные на рис. 3, однозначно свидетельствуют о способности сыворотки иммунизированных мышей выявлять зараженные клетки. Видно, что меченные Alexa Fluor 633 антитела, направленные к суммарному IgG мыши, локализуются на поверхности зараженных клеток (окрашены зеленым) и не выявляют незараженные клетки Vero E6. Полноразмерное антитело fh1A, выявленное мечеными Alexa Fluor 633 антителами, направленными к суммарному IgG человека, также выявляет клетки, зараженные BOB ЛИВП-GFP.

Для проверки способности рекомбинантного белка р35Δ12 вызывать наработку антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами, исследовали вируснейтрализующую активность сывороток иммунизированных мышей. В экспериментах для заражения клеток Vero E6 также использовали вирус BOB ЛИВП-GFP. При инкуба-

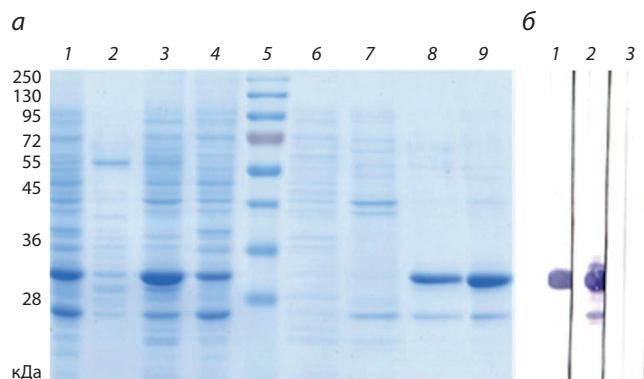


Рис. 1. Электрофореграмма в 12.5 % SDS-ПААГ клеточных и белковых фракций *E. coli* XL1-blue/pQE30-Δ12 (а) и вестерн-блот анализ очищенного белка р35Δ12 (б).

Дорожки в геле: 1 – индуцированная культура клеток *E. coli* XL1-blue/pQE30-Δ12; 2 – периплазматическая фракция; 3 – фракция растворимых белков цитоплазмы; 4 – фракция телец включения; 5 – маркеры молекулярных масс; 6 – фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA; 7 – элюат 25 мМ имидазолом; 8 – элюат 100 мМ имидазолом; 9 – концентрированный очищенный белок р35Δ12. Стрипы нитроцеллюлозной мембраны с перенесенным белком р35Δ12, проявленные: 1 – fh1A; 2 – объединенной сывороткой иммунизированных мышей; 3 – нормальной мышиной сывороткой.

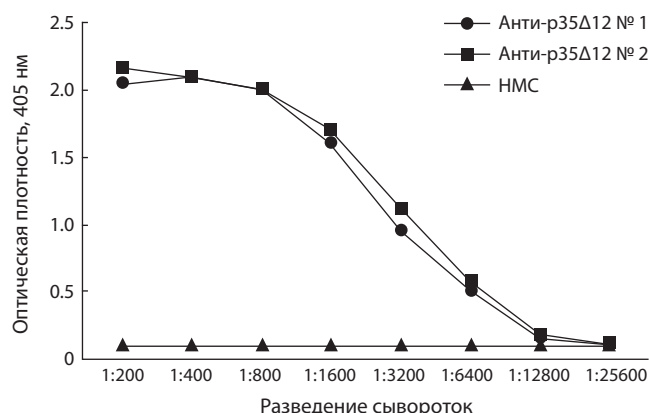


Рис. 2. Иммуноферментный анализ связывания сыворотками иммунизированных мышей и нормальной мышиной сывороткой (НМС) с белком р35Δ12.

ции этого вируса с различными разведениями мышинных сывороток обнаружено снижение инфекционности вируса более чем на 50 % при разведении сывороток 1:20 и 1:100 (рис. 4). Нормальная мышинная сыворотка, полученная от неиммунизированного животного, такой способностью не обладала (см. рис. 4).

Обсуждение

Широкое применение вакцин на основе живого BOB позволило победить натуральную оспу – одно из самых опасных инфекционных заболеваний в истории человечества. Однако после ликвидации натуральной оспы Всемирная организация здравоохранения в 1980 г. рекомендовала прекратить применение вакцин на основе живого вируса осповакцины из-за относительно большого числа серьезных осложнений и побочных эффектов. Использование классических вакцин для массовой вакцинации, вероятно,

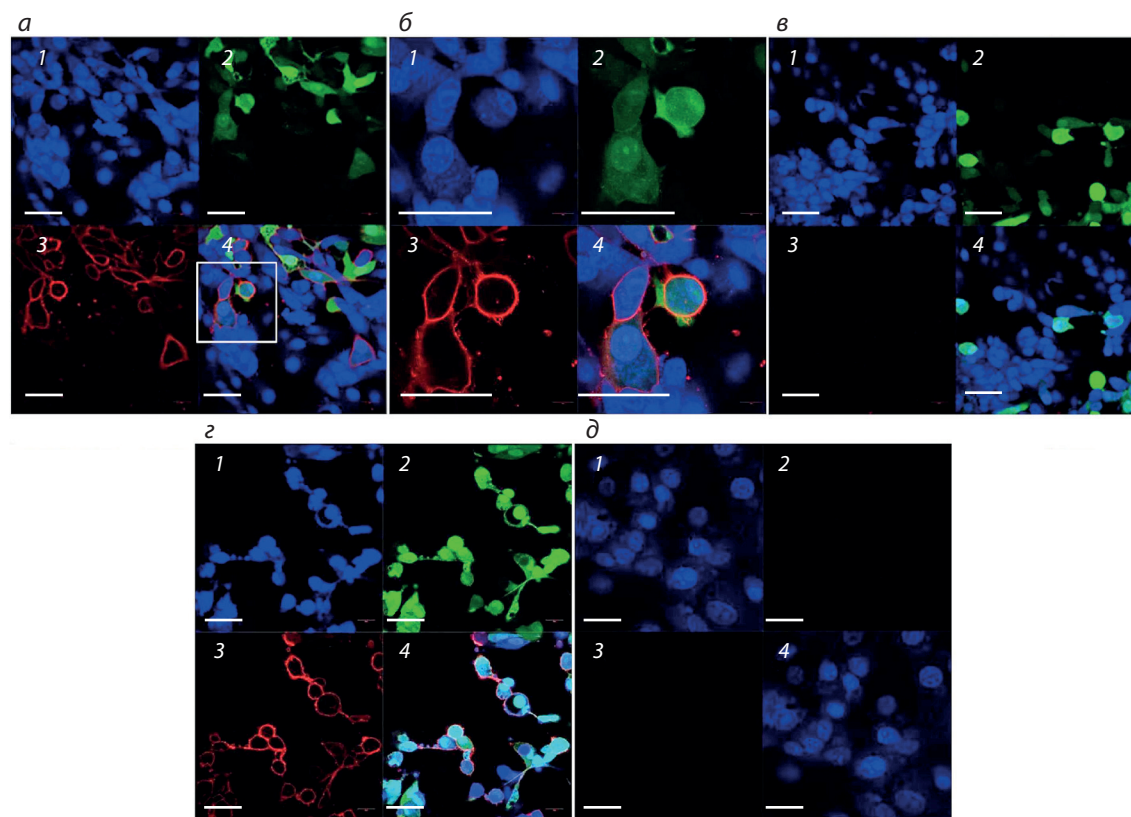


Рис. 3. Конфокальная микроскопия клеток Vero E6, зараженных вирусом осповакцины ЛИВР-РРР.

Монослой зараженных клеток инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных белком р35Δ12 (а, б), с нормальной мышиной сывороткой (в) и с полноразмерным антителом человека fh1A (г). В качестве отрицательного контроля приведен монослой незараженных клеток, инкубированный с сыворотками мышей, иммунизированных белком р35Δ12 (д). Связавшиеся антитела выявляли антивидовыми конъюгатами антител козы против IgG мыши или человека с Alexa Fluor 633. Дополнительно препараты окрашивали DAPI для выявления клеточных ядер. Изображения взаимодействия антител с клетками получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), масштабная шкала соответствует 10 мкм. 1 – сигнал канала DAPI; 2 – сигнал канала GFP; 3 – сигнал канала Alexa Fluor 633; 4 – совмещенное изображение.

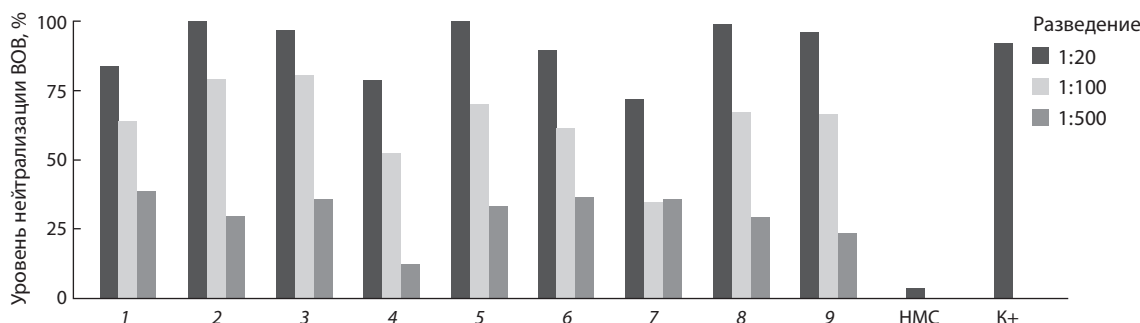


Рис. 4. Нейтрализация различными разведениями сывороток мышей, иммунизированных белком р35Δ12, бляшкообразования вируса осповакцины ЛИВР-РРР на культуре клеток Vero E6.

Приведены результаты вируснейтрализующей активности сывороток девяти иммунизированных мышей, а также нормальной мышиной сыворотки (отрицательный контроль) и сыворотки многократно вакцинированного вирусом осповакцины ЛИВР добровольца (положительный контроль), разведенными в 20 раз.

привело бы к возрастанию числа осложнений, поскольку в последние годы у все большего числа людей регистрируются различного рода нарушения иммунитета. Вместе с тем необходимость в вакцинах, защищающих от ортопоксвирусов, не исчезла, поскольку в природе по-прежнему существуют патогенные для человека ортопоксвирусы, и вспышка оспы обезьян в США из-за вируса, чей природный резервуар находится на другом континенте, доказала

это. Кроме того, периодическая вакцинация необходима для представителей определенных профессий (ученые, изучающие патогенные ортопоксвирусы, медицинские работники и др.) (Petersen et al., 2016).

Разработка вакцин на основе высокоаттенуированных вирусов осповакцины, не способных размножаться в клетках человека (Meyer et al., 1991), привела к получению вакцин MVA и LC16m8 (Meyer et al., 1991; Kidokoro et al.

2005), которые крайне редко вызывают побочные реакции и могут применяться даже для вакцинации индивидуумов с ослабленным иммунитетом (Olson, Shchelkunov, 2017). Эти вакцины не вызывают длительного напряженного иммунитета, и целесообразно их использовать для первой вакцинации (Olson, Shchelkunov, 2017; Shchelkunova, Shchelkunov, 2017). В связи с этим продолжают попытки создания различных вариантов противооспечных вакцин, включая ДНК-вакцины и вакцины на основе генно-инженерных вариантов вируса осповакцины (детально рассмотрено в обзоре (Shchelkunova, Shchelkunov, 2017)). Одним из перспективных подходов является получение субъединичных вакцин для разработки стратегии безопасной вакцинации, включающей на первом этапе вакцинацию субъединичной вакциной, после чего можно было бы применять вакцины на основе аттенуированных ортопоксвирусов. Для создания субъединичных вакцин необходимо детальное исследование потенциальных иммуногенов.

При оспопрививании или инфицировании ортопоксвирусами в организме человека нарабатываются антитела против широкого спектра белков, экспрессируемых на разных стадиях инфекции, причем наряду с мембранными оболочечными белками, которые доступны благодаря их расположению на поверхности вирусной частицы, нарабатываемые антитела специфически взаимодействуют и с коровыми белками вириона (Jones-Trower et al., 2005). В случае ортопоксвирусов наиболее значимыми для формирования иммунитета у человека являются белки B5R, A27L и р35 (Pütz et al., 2006). Первый белок экспонирован на поверхности EEV (внеклеточный оболочечный вирус), а белки A27L и р35 – на поверхности IMV (внутриклеточный зрелый вирус). Антитела против этих белков обладают вируснейтрализующими и протективными свойствами (Pütz et al., 2006). Ранее нами был сконструирован химерный белок р35 вируса оспы коров, содержащий на N-конце β -галактозидазу (Дубровская и др., 2007). Позднее был получен рекомбинантный белок р35 Δ 12, содержащий с 1 по 239 аминокислотные остатки белка р35 вируса оспы коров, и показано, что вируснейтрализующие антитела человека распознают этот белок с высокой эффективностью (Khlusevich et al., 2018).

Заключение

В настоящем исследовании доказано, что белок р35 Δ 12, созданный на основе белка р35 вируса оспы коров, при введении в мышей индуцирует у них образование антител, которые способны не только узнавать клетки, зараженные вирусом осповакцины, но и нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины в экспериментах *in vitro*. При изучении иммунологических свойств полноразмерной формы рекомбинантного белка р35 осповакцины (Lin et al., 2000; Davies et al., 2005) обнаружено, что сыворотки, полученные от иммунизированных животных, также обладали вируснейтрализующими свойствами. Однако в указанных работах исследователи использовали для иммунизации рекомбинантный полноразмерный белок р35 в дозировках, превышающих на порядок дозировку, использованную в нашей работе. Следует отметить, что даже так называемая короткая схема иммунизации – двукратное введение ре-

комбинантного белка р35 в низкой дозировке, обеспечила индукцию вируснейтрализующих антител.

Проведенные эксперименты продемонстрировали высокую иммуногенность белка р35 Δ 12 и целесообразность его возможного использования в качестве компонента субъединичной вакцины или вовлечения гена, кодирующего р35, в ДНК-вакцину. Вместе с тем требуются дальнейшие детальные исследования *in vivo* для оценки протективных свойств белка р35 Δ 12 и предпочтительных схем иммунизации, обеспечивающих защиту мышей от ортопоксвирусных инфекций.

Список литературы / References

- Дубровская В.В., Улитин А.Б., Ламан А.Г., Гилева И.П., Бормотов Н.И., Ильичев А.А., Бровко Ф.А., Щелкунов С.Н., Беланов Е.Ф., Тикунова Н.В. Конструирование комбинаторной иммунной клонотекки одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов и селекция из нее антител к рекомбинантному белку рA30L вируса натуральной оспы. Молекуляр. биология. 2007;41(1):173-185.
- [Dubrovskaya V.V., Ulitin A.B., Laman A.G., Gileva I.P., Bormotov N.I., Il'ichev A.A., Brovko F.A., Schelkunov S.N., Belanov E.F., Tikunova N.V. Construction of combinatorial immune library of human single-chain antibodies to orthopoxviruses and selection of antibodies to recombinant рA30L of the variola virus. Mol. Biol. 2007;41(1):157-167. DOI 10.1134/S0026893307010207.]
- Петров И.С., Гончарова Е.П., Колосова И.В., Поздняков С.Г., Щелкунов С.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. Противоопухолевое действие рекомбинантного вируса осповакцины L1VP-GFP. Докл. АН. 2013;451(5):592-597. DOI 10.7868/S0869565213240274.
- [Petrov I.S., Goncharova E.P., Kolosova I.V., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V. Antitumor effect of the L1VP-GFP recombinant vaccinia virus. Doklady Biological Sciences. 2013;451:248-252. DOI 10.1134/S0012496613040133.]
- Bazzill J.D., Ochyl L.J., Giang E., Castillo S., Law M., Moon J.J. Interrogation of antigen display on individual vaccine nanoparticles for achieving neutralizing antibody responses against hepatitis C virus. Nano Lett. 2018;18:7832-7838. DOI 10.1021/acs.nanolett.8b03601.
- Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhy R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandel B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalo in India. Zoonoses Public Health. 2010;57(7-8):e149-155.
- Buller R.M., Potter M., Wallace G.D. Variable resistance to ectromelia (mousepox) virus among genera of *Mus*. Curr. Top Microbiol. Immunol. 1986;127:319-322.
- Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. Emerg. Infect. Dis. 2009;15(5):777-780.
- Carletti F., Bordini L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission, northeastern Italy. Emerg. Infect. Dis. 2009;15(3):499-500.
- Crotty S., Felgner P., Davies H., Glidewell J., Villarreal L., Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. J. Immunol. 2003;171:4969-4973.
- Davies D.H., McCausland M.M., Valdez C., Huynh D., Hernandez J.E., Mu Y., Hirst S., Villarreal L., Felgner P.L., Crotty S. Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. J. Virol. 2005;79:11724-11733.
- Di Giulio D.B., Eckburg P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. Lancet Infect. Dis. 2004;4(1):15-25.
- Ducournau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védry S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. Emerg. Infect. Dis. 2013;19(12):1996-1999.

- Fulginiti V.A., Papier A., Lane J.M., Neff J.M., Henderson D.A. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. *Clin. Infect. Dis.* 2003;37:251-271.
- Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol.* 2015;173(2):535-539.
- Jezek Z., Marennikova S.S., Mutumbo M., Nakano J.H., Paluku K.M., Szczeniowski M. Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *J. Infect. Dis.* 1986;154(4):551-555.
- Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P., Merchlinsky M. Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (Dryvax) antigens recognized by vaccinia immune globulin. *Virology.* 2005;343:128-140.
- Kawakami Y., Tomimori Y., Yumoto K., Hasegawa S., Ando T., Tagaya Y., Crotty S., Kawakami T. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. *J. Exp. Med.* 2009;206(6):1219-1225.
- Khlusevich Y., Matveev A., Baykov I., Bulychiev L., Bormotov N., Ilyichev I., Shevelev G., Morozova V., Pyshnyi D., Tikunova N. Phage display antibodies against ectromelia virus that neutralize variola virus: selection and implementation for p35 neutralizing epitope mapping. *Antiviral Res.* 2018;152:18-25. DOI 10.1016/j.antiviral.2018.02.006.
- Kidokoro M., Tashiro M., Shida H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(11):4152-4157.
- Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmälä H., Piiparinen H., Siironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimäa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe ocular cowpox in a human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21(12):2261-2263.
- Lin C.L., Chung C.S., Heine H.G., Chang W. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 2000;74:3353-3365.
- MacNeil A., Reynolds M.G., Carroll D.S., Karem K., Braden Z., Lash R., Moundeli A., Mombouli J.V., Jumaan A.O., Schmid D.S., Damon I.K. Monkeypox or maricella? Lessons from a rash outbreak investigation in the Republic of the Congo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009;80(4):503-507.
- McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014;58(2):260-267.
- Medina L.O., To A., Lieberman M.M., Wong T., Namekar M., Nakano E., Andersen H., Yalley-Ogunro J., Greenhouse J., Higgs S., Huang Y.S., Vanlandingham D.L., Horton J.S., Clements D.E., Lehrer A.T. A recombinant subunit based Zika virus vaccine is efficacious in non-human primates. *Front. Immunol.* 2018;9:2464. DOI 10.3389/fimmu.2018.02464.
- Meyer H., Sutter G., Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 1991;72:1031-1038.
- Moss B. Poxviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.). *Fields Virology*. Six ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013; 2129-2159.
- Nakazawa Y., Mauldin M.R., Emerson G.L., Reynolds M.G., Lash R.R., Gao J., Zhao H., Li Y., Muyembe J.J., Kingebeni P.M., Wemakoy O., Malekani J., Karem K.L., Damon I.K., Carroll D.S. A phylogeographic investigation of African monkeypox. *Viruses.* 2015;7(4):2168-2184.
- Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781-784.
- Olson V., Shchelkunov S. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses.* 2017;9(9):242.
- Petersen B.W., Harms T.J., Reynolds M.G., Harrison L.H. Use of vaccinia virus smallpox vaccine in laboratory and health care personnel at risk for occupational exposure to orthopoxviruses – recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2015. *Morb. Mortal. Wkly Rep. (MMWR).* 2016;65(10):257-262. DOI 10.15585/mmwr.mm6510a2.
- Pütz M.M., Midley C.M., Law M., Smith G.L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious of vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccinations. *Nat. Med.* 2006;12(11):1310-1315.
- Reynolds M.G., Emerson G.L., Pukuta E., Karhemere S., Muyembe J.J., Bikindou A., McCollum A.M., Moses C., Wilkins K., Zhao H., Damon I.K., Karem K.L., Li Y., Carroll D.S., Mombouli J.V. Detection of human monkeypox in the Republic of the Congo following intensive community education. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013;88(5): 982-985.
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Oki-tolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(37):16262-16267.
- Riyesh T., Karuppusamy S., Bera B.C., Barua S., Virmani N., Yadav S., Vaid R.K., Anand T., Bansal M., Malik P., Pahuja I., Singh R.K. Laboratory-acquired buffalopox virus infection, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(2):324-326.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 2005.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. 40 years without smallpox. *Acta Naturae.* 2017;9(4):4-12.
- Shi D.Y., Chen B.Y., Mao Y.Y., Zhou G., Lu J.S., Yu Y.Z., Zhou X.W., Sun Z.W. Development and evaluation of candidate subunit vaccine against botulinum neurotoxin serotype B. *Hum. Vaccin. Immunother. Publ. online* 2018. *Publ.* 2019;15(3):755-760. DOI 10.1080/21645515.2018.1547613.
- Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009;44(4):308-313.
- Smith K.A. Smallpox: can we still learn from the journey to eradication? *Indian J. Med. Res.* 2013;137(5):895-899.
- Trindade G.S., Guedes M.I., Drumond B.P., Mota B.E., Abrahão J.S., Lobato Z.I., Gomes J.A., Corrêa-Oliveira R., Nogueira M.L., Kroon E.G., da Fonseca F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Dis.* 2009;48(3):e37-40.
- Wang Y.B., Wang L.P., Li P. Perspectives on novel vaccine development. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018;21(3):643-649.
- Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007;13(6):902-904.

ORCID ID

Ya.A. Khlusevich orcid.org/0000-0002-1413-5876
A.L. Matveev orcid.org/0000-0002-6884-6104
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 16-14-00083.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.11.2018. После доработки 04.03.2019. Принята к публикации 22.03.2019.

Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения

А.В. Щенникова , А.М. Камионская, А.В. Нежданова, К.С. Гаврилова, М.А. Филюшин, Е.З. Кочиева, К.Г. Скрыбин

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии, Москва, Россия

 e-mail: shchennikova@yandex.ru

Считается, что полный микогетеротроф, поддельник *Monotropa hypopitys*, адаптивно эволюционировал из фотосинтезирующего микоризного предшественника, потеряв при этом аппарат фотосинтеза и вегетативные органы (стебель и листья). Надземная часть растения представляет собой цветонос со стерильными прицветниками и соцветием с каноническим для высших растений типом цветка. У растений происхождения плоского листа и других листовидных латеральных органов связывают с эволюцией генов *YABBY*, которые, в зависимости от профиля экспрессии, разделяются на «вегетативные» и эволюционно более поздние «репродуктивные» гены. Изучение «вегетативных» генов *YABBY* поддельника позволит выяснить, сохранились ли их функции (определение идентичности клеток абаксиальной поверхности латеральных органов) у растения без листьев. В настоящем исследовании проведен структурно-филогенетический анализ генов поддельника *MhyFIL1* и *MhyFIL3*, охарактеризованы основные консервативные домены и мотивы кодируемых ими белков и подтверждена принадлежность генов к «вегетативной» кладе *YABBY3/FIL*. Проведена оценка влияния гетерологичной эктопической экспрессии генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3* на фенотип трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum*. Показано, что оба типа растений, *35S::MhyFIL1* и *35S::MhyFIL3*, формируют листья более узкие, чем в норме, и скрученные за счет измененной идентичности клеток адаксиальной поверхности. Выявлены также изменения архитектуры надземной части и корневой системы растений, включая aberrantный филлотаксис и подавление развития апикальных меристем побега и корня. Часть растений *35S::MhyFIL1* и *35S::MhyFIL3* погибала еще на стадии формирования первых листьев, часть не цвела, остальные имели сильно увеличенный период вегетации и при цветении формировали меньше цветков, чем в норме. Цветки не имели видимых отличий от контроля, за исключением ломких цветоножек. Таким образом, отсутствие изменений в строении цветка поддельника в сравнении с автотрофными видами, а также особенности влияния гетерологичной экспрессии генов *MhyFIL1/3* на развитие растений табака говорят о сохранении генами поддельника *MhyFIL1/3* функции «вегетативных» генов *YABBY*. При этом у *M. hypopitys* активность *YABBY*-факторов транскрипции группы *FIL* напрямую не связана с потерей способности формировать листья при эволюционном переходе поддельника от автотрофного питания к гетеротрофии.

Ключевые слова: *Monotropa hypopitys*; микогетеротроф; гетерологичная экспрессия гена; абаксиально-адаксиальная асимметрия; транскрипционные факторы *YABBY*; «вегетативные» *YABBY*; FILAMENTOUS FLOWER.

Для цитирования: Щенникова А.В., Камионская А.М., Нежданова А.В., Гаврилова К.С., Филюшин М.А., Кочиева Е.З., Скрыбин К.Г. Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):405-411. DOI 10.18699/VJ19.509

Transcription factors MhyFIL1 and MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) determine the asymmetric development of above-ground lateral organs in plants

A.V. Shchennikova , A.M. Kamionskaya, A.V. Nezhdanova, K.S. Gavrilo, M.A. Filyushin, E.Z. Kochieva, K.G. Skryabin

Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia

 e-mail: shchennikova@yandex.ru

It is believed that the complete mycoheterotroph pinesap *Monotropa hypopitys* adaptively evolved from a photosynthetic mycorrhizal ancestor, which had lost its photosynthetic apparatus and vegetative organs (stem and leaves). The aerial part of the plant is a reproductive axis with sterile bracts and inflorescence with a flower type canonical for higher plants. The origin of leaves and leaf-like lateral organs is associated, among other factors, with the evolution of the *YABBY* genes, which are divided into "vegetative" and evolutionarily recent "reproductive" genes, with regard to their expression profiles. The study of the vegetative *YABBY* genes in pinesap will determine whether their functions (identification of cell identity on the abaxial surface of the lateral organs) are preserved in the leafless plant. In this

study, the structural and phylogenetic analysis of the pinesap vegetative genes *MhyFIL1* and *MhyFIL3* is performed, the main conserved domains and motifs of the encoded proteins are characterized, and it is confirmed that the genes belong to the vegetative clade *YABBY3/FIL*. The effect of heterologous ectopic expression of the *MhyFIL1* and *MhyFIL3* genes on the phenotype of transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* is evaluated. The leaves formed by both types of plants, 35S::*MhyFIL1* and 35S::*MhyFIL3*, were narrower than in control plants and were twisted due to the changed identity of adaxial surface cells. Also, changes in the architecture of the aerial part and the root system of transgenic plants, including aberrant phyllotaxis and arrest of the shoot and root apical meristem development, were noted. Some of the 35S::*MhyFIL1* and 35S::*MhyFIL3* plants died as early as the stage of the formation of the first leaves, others did not bloom, and still others had a greatly prolonged vegetation period and formed fewer flowers than normal ones. The flowers had no visible differences from the control except for fragile pedicels. Thus, the absence of structural changes from the *M. hypopitys* flower in comparison to autotrophic species and the effect of *MhyFIL1/3* heterologous expression on the development of tobacco plants indicate the preservation of the functions of the vegetative *YABBY* genes by the *MhyFIL1/3* genes in pinesap. Moreover, the activity of *YABBY* transcription factors of the *FIL* clade in *M. hypopitys* is not directly related to the loss of the ability of pinesap to form leaves during the evolutionary transition from autotrophic nutrition to heterotrophy.

Key words: *Monotropa hypopitys*; mycoheterotroph; heterologous gene expression; abaxial-adaxial asymmetry; transcription factors; *YABBY*; "vegetative" *YABBYs*; FILAMENTOUS FLOWER.

For citation: Shchennikova A.V., Kamionskaya A.M., Nezhdanova A.V., Gavrilova K.S., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Skryabin K.G. Transcription factors *MhyFIL1* and *MhyFIL3* (*Monotropa hypopitys*) determine the asymmetric development of above-ground lateral organs in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):405-411. DOI 10.18699/VJ19.509 (in Russian)

Введение

Самым значимым событием в эволюции растений принято считать возникновение фотосинтеза, благодаря которому большинство современных растений является автотрофами и только около 1 % цветковых растений гетеротрофны. Среди последних особое место занимают полные микогетеротрофы, которые в процессе адаптации к неблагоприятным условиям среды обитания обрели способность получать питательные вещества через микоризу (симбиотическую ассоциацию корней с грибами). Спектр последствий подобного приспособления достаточно широк: неспособность к фотосинтезу влечет за собой деградацию и перестройку генома, массивную потерю функциональных генов и др. (Wicke et al., 2016; Graham et al., 2017).

Монотропоидный тип микоризы характерен только для представителей подсемейства *Monotropoideae* семейства *Ericaceae* (Leake, 1994), в том числе для поддельника *Monotropa hypopitys* (синоним *Hypopitys monotropa*). Сравнение геномов бесхлорофилльного *M. hypopitys* и родственного ему фотосинтезирующего вида *Pyrola rotundifolia* выявило существенные структурные перестройки и повышенную скорость накопления нуклеотидных замен в генах поддельника, значительные сокращения его пластома, а также потерю им генетического аппарата фотосинтеза как в пластоме, так и в ядерном геноме (Ravin et al., 2016; Graham et al., 2017). Подобные изменения часто приводят к деградации и/или модификации вегетативных структур (Graham et al., 2017). Так, поддельник не только лишен хлорофилла, но и не образует надземных вегетативных органов: из адвентивных почек в его микоризной корневой системе сразу развивается цветонос, несущий стерильные прицветники и соцветие (Wallace, 1975; Merckx et al., 2013).

Развитие фотосинтеза тесно связано с эволюцией листа, который из радиально-симметричного стал асимметричным, увеличив, таким образом, инсоляцию своей поверхности (Stewart, Rothwell, 1993; Cronk, 2001; Bowman et al., 2002; Beerling, Fleming, 2007). Считается, что

одной из причин возникновения асимметричного листа семенных растений стали явления дупликации и диверсификации генов *YABBY* (Eckardt, 2010). Эволюция предшественника *YABBY* привела к появлению семейства генов с разной специализацией, что могло быть связано с дальнейшими преобразованиями листа и возникновением других асимметричных органов, составляющих цветок (Mathews, Kramer, 2012).

Для современных растений характерна абаксиально-адаксиальная асимметрия всех латеральных органов. Одним из основных факторов, определяющих идентичность абаксиальной (нижней) поверхности органов, являются факторы транскрипции семейства *YABBY* (Bowman et al., 2002; Bartholmes et al., 2012). У покрытосеменных растений выделяют пять подсемейств *YABBY*: три «вегетативных» – *YABBY1/YABBY3* (FILAMENTOUS FLOWER (FIL)), *YABBY2/FASCIATED* (FAS) и *YABBY5* и два «репродуктивных» – *CRABS CLAW* (CRC) и *INNER NO OUTER* (INO) (Yamada et al., 2011; Bartholmes et al., 2012; Finet et al., 2016). «Репродуктивные» *YABBY* имеют узкую специализацию, в то время как «вегетативные» *YABBY* участвуют в определении полярного развития вегетативных и репродуктивных органов, а также важны для правильной организации и филлотаксиса апикальной меристемы побега (McConnell, Barton, 1998; Bartholmes et al., 2012). Таким образом, гены «вегетативных» факторов *YABBY* сохранили профиль экспрессии гена-предшественника, хотя и не способны полностью функционально заместить «репродуктивные» *YABBY* (Yamada et al., 2011; Bartholmes et al., 2012).

Изучение генов *YABBY* полного микогетеротрофа *M. hypopitys* могло бы прояснить возможность сохранения «вегетативными» *YABBY* функций гена-предшественника при потере вегетативных органов. Ранее у поддельника идентифицированы «вегетативные» гены подсемейств *YABBY5* (*MhyYAB5*) и *YABBY3/FIL* (*MhyFIL1*, *MhyFIL2* и *MhyFIL3*) с противоположной динамикой экспрессии (Shchennikova et al., 2018). При этом в прицветниках, которые эволюционно ближе к листьям, чем к органам

цветка, наблюдаются лишь следовые количества транскриптов *MhyFIL2*, а экспрессия *MhyFIL1* и *MhyFIL3* в 5–10 раз ниже экспрессии *MhyYAB5* (Shchennikova et al., 2018). При отсутствии нормальных листьев у подбельника пониженная экспрессия генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3* в прицветниках может свидетельствовать о возможной утрате ими части активности «вегетативных» *YABBY*.

В данной работе мы провели функциональный анализ «вегетативных» генов *YABBY*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3*, у лишенного листьев подбельника *M. hypopitys*. Исследование гомологов генов, определяющих асимметрию листа высших растений, у вида, являющегося полным микогетеротрофом, может расширить представления об эволюции семейства факторов транскрипции *YABBY* в процессе драматической адаптивной перестройки растения.

Материалы и методы

В работе были использованы данные анализа транскриптомов корня, стерильного прицветника и цветка (на стадии антезис) *M. hypopitys* (Beletsky et al., 2016). Для амплификации и клонирования кодирующей последовательности генов подбельника семейства *YABBY*, *MhyFIL1* и *MhyFIL3*, на основании идентифицированных ранее транскриптов генов (Shchennikova et al., 2018) были подобраны праймеры: прямой – 5'-catcatgtctctctcaattctt-3' (для обоих генов) и обратные – 5'-cttcttgattagtagggggagaca-3' (*MhyFIL1*) и 5'-cttcttgattagtagggggagacc-3' (*MhyFIL3*). Из цветка подбельника, где экспрессия генов максимальна, была выделена суммарная РНК (с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, США) и использована для синтеза кДНК (набор the Reverse Transcription System, Promega, США). На кДНК-матрице с помощью ПЦП (условия: денатурация при 95 °C – 5 мин; 30 циклов денатурации (94 °C – 30 с), отжига (55 °C – 30 с) и синтеза (72 °C – 1 мин); достройка фрагментов (72 °C – 7 мин)) была проведена амплификация полноразмерных кДНК *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. ПЦП-фрагменты ожидаемой длины были очищены (набор MinElute Gel Extraction Kit; QIAGEN, США), клонированы в плазмидный вектор pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, США) и секвенированы (ЦКП «Биоинженерия», ФИЦ Биотехнологии РАН). Анализ последовательностей фрагментов показал, что были амплифицированы и клонированы именно кДНК генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Для структурного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали программы Clone Manager 7.11 (<http://clone-manager-professional.software.informer.com/>), NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и MEME 5.0.1 (Bailey, Elkan, 1994). Выравнивание последовательностей генов и кодируемых ими белков проводили с помощью ClustalX (Larkin et al., 2007) и MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Для филогенетического исследования белков использовали NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) с построением дерева методом максимального правдоподобия, основанного на модели JTT (Zuckerandl, Pauling, 1965). Для функционального анализа факторов транскрипции *MhyFIL1* и *MhyFIL3* получали трансгенные модельные растения табака *Nicotiana tabacum* с индивидуальной конститутивной экспрессией каждого из генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Для этого были

сконструированы два бинарных вектора на основе pBin19, содержащие кассету экспрессии кДНК гена (*MhyFIL1*/*MhyFIL3*) в смысловой ориентации под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и терминатора гена нопалинсинтазы NOS. Штаммами *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущими полученные конструкции, проводили трансформацию листовых эксплантов табака с последующей регенерацией трансгенных побегов на селективной среде, как было описано ранее (Goloveshkina et al., 2012). Регенеранты проверяли на наличие в геноме трансгена с помощью ПЦП с праймерами, специфичными к последовательностям 3'-конца каждого гена (см. выше) и промотора 35S (5'-caatccactatccttcgc aagaccs-3'). Фенотип растений, давших положительный ПЦП-сигнал, сравнивали с контролем (нетрансгенное растение табака), оценивая следующие параметры: период вегетации (от высадки в теплицу до закладки соцветия), строение надземной вегетативной части растения, а также фенотип корня, листа и цветковых органов.

Результаты

Структурно-филогенетический анализ последовательностей известных белков MhyFIL (Shchennikova et al., 2018) с использованием программ NCBI-BLAST, NCBI-CDD и MEGA 6.0 подтвердил их принадлежность кладе YABBY3/FIL (рис. 1). При этом MhyFIL3 располагался ближе к предшественнику, чем два других белка – MhyFIL1 и MhyFIL2. Как и ожидалось, ближайшими родственниками MhyFILs оказались представители клады YABBY3/FIL видов порядка Ericales базальной группы подкласса Asterids, к которому принадлежит и подбельник (см. рис. 1). Члены клады YABBY3/FIL других групп Asterids формировали сестринский субкластер (см. рис. 1). Внутри клады YABBY3/FIL белки подкласса Rosids (на примере *Arabidopsis thaliana*) образовали базальный субкластер по отношению к анализируемым белкам Asterids (см. рис. 1). Анализ возможных консервативных мотивов (MEME 5.0.1) в составе анализируемых белков выявил присутствие двух последовательностей, характерных для всех YABBY-факторов транскрипции и соответствующих доменам цинкового пальца (zinc finger, ZF) и YABBY (Bartholmes et al., 2012). При этом белки клады YABBY3/FIL отличаются от членов других клад присутствием шести кладоспецифичных (междоменных и С-концевых) мотивов, а белки Asterids, включая Ericales, имеют N-концевой мотив, которого нет у YABBY3/FIL-белков *A. thaliana* (Rosids) (см. рис. 1). Согласно полученной схеме консервативных мотивов, все три белка MhyFIL структурно ближе к фактору транскрипции FIL, чем к YABBY3 (*A. thaliana*) (см. рис. 1).

Для функционального анализа факторов транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 были получены трансгенные модельные растения табака *N. tabacum* с индивидуальной конститутивной экспрессией кДНК каждого из генов *MhyFIL1* и *MhyFIL3*. Независимые трансгенные регенеранты T₀ 35S::*MhyFIL1* (3 шт.) и 35S::*MhyFIL3* (12 шт.), укоренившиеся и давшие настоящие зеленые листья, были адаптированы к теплице.

В сравнении с контролем (нетрансгенное растение табака) полученные растения, как 35S::*MhyFIL1*, так и

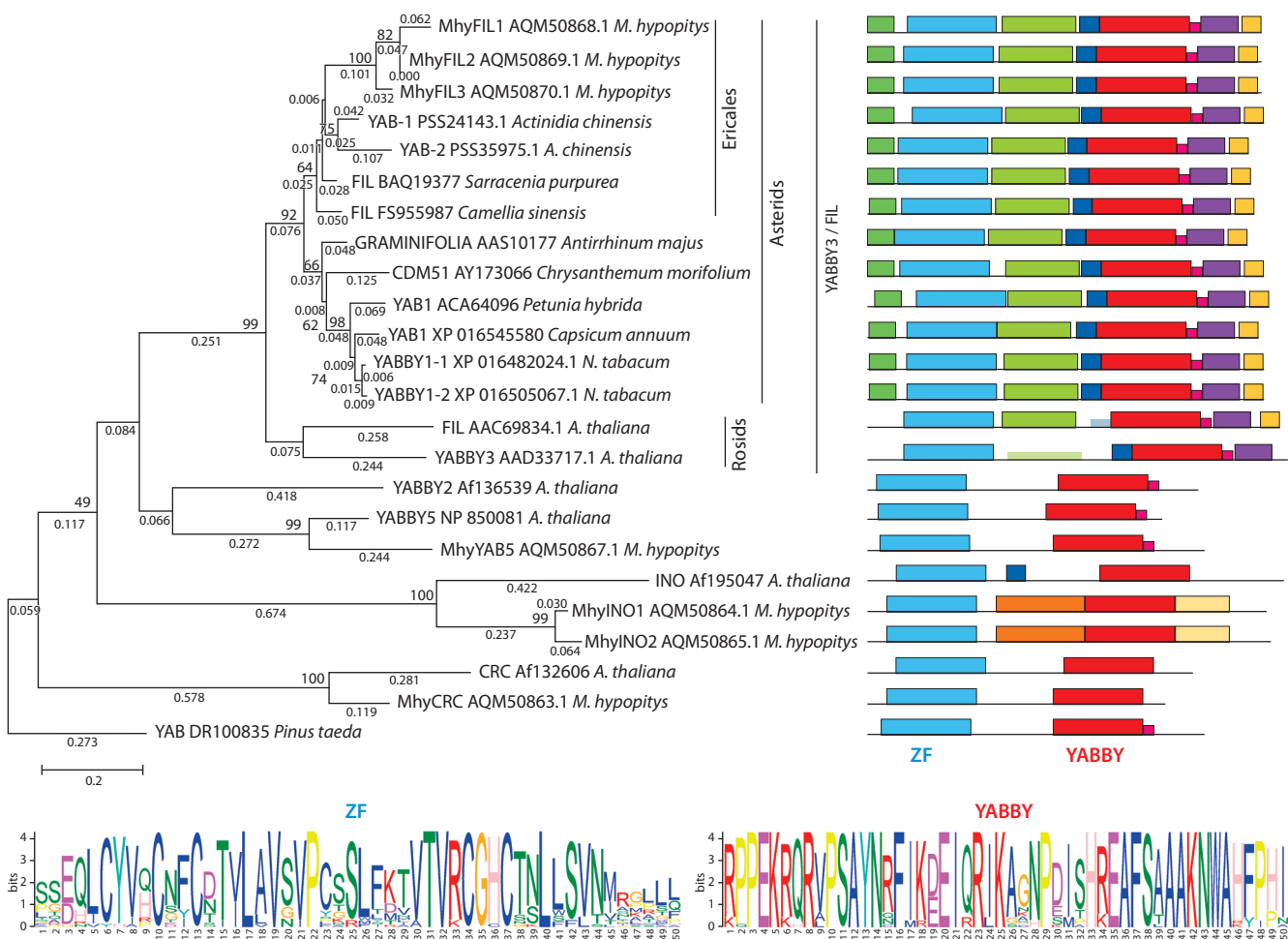


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе выравнивания 24 аминокислотных последовательностей YABBY-факторов транскрипции подъяльника и других видов растений. Анализ проведен в программе MEGA 6.0 методом максимального правдоподобия, основанном на модели JTT (Tamura et al., 2013).

Дерево укоренено с использованием последовательности YAB *Pinus taeda*. Длина ветвей, оцениваемая в генетической дистанции (число замещений на сайт), и существенные значения bootstrap для 1000 выборок показаны в основании ветвей. Против названий белков из базы данных NCBI указан номер доступа. Справа от дендрограммы – схема консервативных мотивов анализируемых белков, полученная в результате анализа их последовательностей в программе MEME 5.0.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>). Внизу приведены последовательности двух мотивов, соответствующих доменам цинкового пальца (ZF) и YABBY.

35S::*MhyFIL3*, кустились (вместо формирования одного стебля), имели значительно увеличенный вегетационный период (в среднем 282 дня против контрольных 48 дней), закрученные в направлении абаксиальной поверхности листья (с измененной идентичностью адаксиальной поверхности) и сильно утолщенный и укороченный корень с аномальными листовидными выростами (вместо разветвленной корневой системы) (рис. 2).

Цветonoсы, образующиеся на одном из побегов «куста» растений 35S::*MhyFIL1* и 35S::*MhyFIL3*, формировали цветки, внешне сходные с цветками дикого типа, но с часто отмирающими/ломкими цветоножками. Семена были получены только от шести растений 35S::*MhyFIL3* и двух растений 35S::*MhyFIL1*. В поколении T₁ изменения морфологии усилились. Лишь одно кустистое растение 35S::*MhyFIL3* сформировало побег дикого типа, который зацвел и дал семена. Полученные семена проросли, однако проростки характеризовались аномальным развитием корня (сильное укорочение и остановка в разви-

тии) и меристемы побега (максимальная высота побега 1.5–3.0 см, кустистость, ранняя остановка в развитии), что приводило к гибели проростков. В связи с этим дальнейший анализ трансгенного фенотипа провести не удалось.

Микроскопический анализ листьев трансгенных растений в сравнении с контролем подтвердил, что идентичность клеток адаксиальной поверхности частично изменилась под влиянием гетерологичной экспрессии каждого из трансгенов (появились структуры, напоминающие устьица, которых в норме не должно быть на верхней поверхности листа), за счет чего, вероятно, и происходило закручивание листьев.

Обсуждение

Принято считать, что микогетеротрофные растения адаптивно эволюционировали из фотосинтезирующих микоризных линий, при этом существование таких растений в условиях слабого освещения привело к инактивации и потере аппарата фотосинтеза (Bidartondo, 2005; Buchanan-

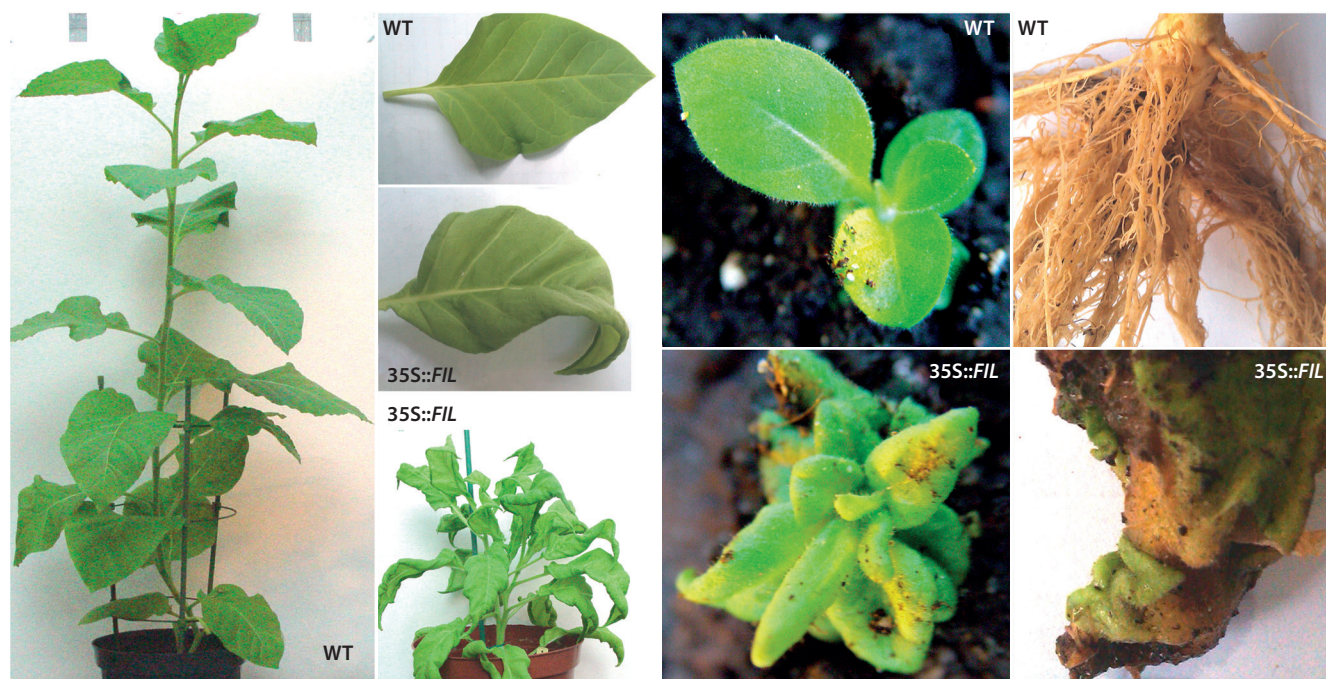


Рис. 2. Трансгенные растения табака 35S::FIL1/3 (35S::FIL) в сравнении с контрольным нетрансгенным растением *N. tabacum* (WT).

Wollaston et al., 2005; Zhang, Zhou, 2013; Ravin et al., 2016). У поддельника *M. hypopitys* это, вероятно, стало причиной последующего исчезновения более не нужных надземных вегетативных структур, включая листья (Wallace, 1975; Merckx et al., 2013). Внешне лишенный хлорофилла цветонос поддельника часто принимают за стебель с листьями. Однако присутствие в стерильных прицветниках («листьях») транскриптов MADS-box-генов, гомологичных *APETALA3*, *TM6* и *SEPALLATA3*, которые у высших растений в норме экспрессируются исключительно в цветке, явилось одним из подтверждений репродуктивной природы надземной части *M. hypopitys* (Shulga et al., 2018).

Происхождение асимметричных листьев и их дальнейшие преобразования, включая возникновение асимметричных цветковых органов, как уже говорилось выше, связывают с эволюционной дупликацией и диверсификацией специфичных только для растений генов *YABBY* (Eckardt, 2010; Mathews, Kramer, 2012). Структура и функция данных генов детально охарактеризована у фотосинтезирующих модельных и других видов растений (Bowman, 2000; Bowman et al., 2002; Finet et al., 2016; Strable et al., 2017). У полных микогетеротрофов гены *YABBY* также присутствуют и транскрибируются (Shchennikova et al., 2018). Неясно, однако, сохранились ли функции «вегетативных» генов *YABBY* у подобных, не формирующих листьев растений.

В настоящей работе были исследованы возможные функции двух «вегетативных» генов *YABBY* поддельника – *MhyFIL1* и *MhyFIL3* – с помощью получения и характеристики двух видов трансгенных растений табака с гиперэкспрессией каждого из анализируемых генов.

Одновременный нокаут всех «вегетативных» генов *YABBY* у растения *A. thaliana* приводит к формированию

узких скрученных или радиально-симметричных листьев, так как все клетки листа становятся адаксиальными (Stahle et al., 2009). В случае же гиперэкспрессии таких генов теоретически также должно наблюдаться формирование радиально-симметричных листьев, только с абаксиальной идентичностью. Наблюдаемое сужение и закручивание листьев в растениях 35S::*MhyFIL1/3* подтверждает это предположение.

Интересно, что вышеописанные эффекты имели место при гетерологичной гиперэкспрессии *FIL*-генов *BraYAB1-702* (*Brassica rapa*) и *TaYAB1* (*Triticum aestivum*) в трансгенных растениях *A. thaliana* (Zhao et al., 2006; Zhang et al., 2013). Оба вида (*B. rapa* и *T. aestivum*) – фотосинтезирующие автотрофы, поэтому сходство проявления конститутивной экспрессии генов *BraYAB1-702* и *TaYAB1* в *A. thaliana* с влиянием экспрессии *MhyFIL1/3* в трансгенных модельных растениях табака говорит о сохранении *FIL*-генами поддельника части функции гена-предшественника, касающейся определения идентичности клеток абаксиальной поверхности листьев.

Правильный морфогенез меристемы зависит от корректной активности *FIL*-генов (Bartholmes et al., 2012). К примеру, для растений *A. thaliana* с двойной мутацией *fil yab3*, помимо других дефектов, характерен абберрантный филлотаксис (Goldshmidt et al., 2008). Показано, что фактор транскрипции *FIL* неавтономно и последовательно влияет на филлотаксис и рост зачатков латеральных органов, координируя экспрессию маркеров (*WUSCHEL*, *CLAVATA3* (*CLV3*)) центральной зоны апикальной меристемы побега (Goldshmidt et al., 2008). А эктопическая экспрессия *SrGRAM* (*FIL*-ген у *Streptocarpus rexii*) полностью подавляет развитие меристемы побега *A. thaliana* (Tononi et al., 2010). Нарушения архитектуры надземной части трансгенных растений 35S::*MhyFIL1/3* и, как след-

ствие, сильно увеличенное время вегетации могут, таким образом, быть следствием аберрантного филлотаксиса вплоть до остановки развития апикальной меристемы побега, вызванной эктопической гиперэкспрессией генов *MhyFIL1/3*.

Следует особо выделить драматические изменения корневой структуры растений 35S::*MhyFIL1/3*. Мы не нашли в опубликованных ранее статьях сведений о том, что происходит с корнями подобных растений. Возможно, исследователи не концентрировались на этом аспекте, поскольку в норме гены *YABBY* экспрессируются только в листьях и цветке и, следовательно, их функции связаны исключительно с этими органами (Siegfried et al., 1999; Sarojam et al., 2010). Действительно, различные комбинации *yabby*-мутаций у *A. thaliana* не влияют на развитие корня (Boter et al., 2015). Апикальные меристемы корня и побега поддерживаются сходным образом, и маркерами покоящегося центра корневой меристемы являются гены *CLV3* и *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)* (Fiers et al., 2005; Stahl et al., 2009; Chu et al., 2013). Исходя из этого, можно предположить, что фенотип корня 35S::*MhyFIL1/3* – следствие подавления развития апикальной корневой меристемы из-за вмешательства фактора транскрипции *MhyFIL1/3* в регуляцию экспрессии генов *N. tabacum*, гомологичных *CLV3* и *WOX5*.

Закключение

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что, несмотря на отсутствие у поддельника надземных вегетативных органов, гены *MhyFIL1/3* сохранили функцию «вегетативных» генов *YABBY*. У *M. hypopitys* факторы транскрипции FIL1 и FIL3 по-прежнему определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения. Это следует из нормального строения органов цветка поддельника и особенностей влияния гетерологичной экспрессии генов *MhyFIL1/3* на развитие растения табака, в частности его листьев. Таким образом, активность генов *MhyFIL1/3* напрямую не связана с потерей поддельником способности формировать листья при эволюционном переходе от аутоτροφного питания к гетеротрофии.

Список литературы / References

Bailey T.L., Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 1994;2:28-36.
Bartholmes C., Hidalgo O., Gleissberg S. Evolution of the *YABBY* gene family with emphasis on the basal eudicot *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Plant Biol. (Stuttg.)*. 2012;14(1):11-23. DOI 10.1111/j.1438-8677.2011.00486.x.
Beerling D.J., Fleming A.J. Zimmermann's telome theory of megaphyll leaf evolution: a molecular and cellular critique. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007;10(1):4-12. DOI 10.1016/j.pbi.2006.11.006.
Beletsky A.V., Filyushin M.A., Gruzdev E.V., Mazur A.M., Prokhor-tchouk E.B., Kochieva E.Z., Mardanov A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G. *De novo* transcriptome assembly of the mycoheterotrophic plant *Monotropa hypopitys*. *Genom Data*. 2016;11:60-61. DOI 10.1016/j.gdata.2016.11.020.
Bidartondo M.I. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytol.* 2005;167(2):335-352. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01429.x.

Boter M., Golz J.F., Giménez-Ibañez S., Fernandez-Barbero G., Franco-Zorrilla J.M., Solano R. FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of jaz3 and modulates responses to jasmonate. *Plant Cell*. 2015;27(11):3160-3174. DOI 10.1105/tpc.15.00220.
Bowman J.L. The *YABBY* gene family and abaxial cell fate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000;3(1):17-22. DOI 10.1016/S1369-5266(99)00035-7.
Bowman J.L., Eshed Y., Baum S.F. Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. *Trends Genet.* 2002;18(3):134-141. DOI 10.1016/S0168-9525(01)02601-4.
Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2005;42(4):567-585. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2005.02399.x.
Chu H., Liang W., Li J., Hong F., Wu Y., Wang L., Wang J., Wu P., Liu C., Zhang Q., Xu J., Zhang D. A CLE-WOX signalling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. *J. Exp. Bot.* 2013;64(17):5359-5369. DOI 10.1093/jxb/ert301.
Cronk Q.C.B. Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(8):607-619. DOI 10.1038/35084556.
Eckardt N.A. *YABBY* genes and the development and origin of seed plant leaves. *Plant Cell*. 2010;22(7):2103. DOI 10.1105/tpc.110.220710.
Fiers M., Golemic E., Xu J., van der Geest L., Heidstra R., Stiekema W., Liu C.M. The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a *CLAVATA2*-dependent pathway. *Plant Cell*. 2005;17(9):2542-2553. DOI 10.1105/tpc.105.034009.
Finet C., Floyd S.K., Conway S.J., Zhong B., Scutt C.P., Bowman J.L. Evolution of the *YABBY* gene family in seed plants. *Evol. Dev.* 2016;18(2):116-126. DOI 10.1111/ede.12173.
Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y. Signals derived from *YABBY* gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. *Plant Cell*. 2008;20(5):1217-1230. DOI 10.1105/tpc.107.057877.
Goloveshkina E.N., Shchennikova A.V., Kamionskaya A.M., Skryabin K.G., Shulga O.A. Influence of ectopic expression of Asteraceae MADS box genes on plant ontogeny in tobacco. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2012;109(1):61-71. DOI 10.1007/s11240-011-0074-9.
Graham S.W.G., Lam V.K.Y., Merckx V.S.F.T. Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotrophic plastid genomes. *New Phytologist*. 2017;214:48-55. DOI 10.1111/nph.14398.
Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-2948. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.
Leake J.R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.* 1994;127:171-216. DOI 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x.
Mathews S., Kramer E.M. The evolution of reproductive structures in seed plants: a re-examination based on insights from developmental genetics. *New Phytol.* 2012;194(4):910-923. DOI 10.1111/j.1469-8137.2012.04091.x.
McConnell J.R., Barton M.K. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development*. 1998;125(15):2935-2942.
Merckx V.S.F.T., Freudenstein J.V., Kissling J., Christenhusz M.J.M., Stotler R.E., Crandall-Stotler B., Wickett N., Rudall P.J., Maas-van de Kamer H., Maas P.J.M. Taxonomy and classification. Ed. V.S.F.T. Merckx. *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. New York: Springer Science+Business Media, 2013; 73-83. DOI 10.1007/978-1-4614-5209-6_1.
Ravin N.V., Gruzdev E.V., Beletsky A.V., Mazur A.M., Prokhor-tchouk E.B., Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Skryabin K.G. The loss of photosynthetic pathways in

- the plastid and nuclear genomes of the non-photosynthetic myco-heterotrophic eudicot *Monotropa hypopitys*. BMC Plant Biol. 2016; 16(Suppl. 3):238. DOI 10.1186/s12870-016-0929-7.
- Sarojram R., Sappl P.G., Goldshmidt A., Efroni I., Floyd S.K., Eshed Y., Bowman J.L. Differentiating *Arabidopsis* shoots from leaves by combined *YABBY* activities. Plant Cell. 2010;22:2113-2130. DOI 10.1105/tpc.110.075853.
- Shchennikova A.V., Slugina M.A., Beletsky A.V., Filyushin M.A., Mardanov A.A., Shulga O.A., Kochieva E.Z., Ravin N.V., Skryabin K.G. The *YABBY* genes of leaf and leaf-like organ polarity in leafless plant *Monotropa hypopitys*. Int. J. Genomics. 2018;2018:7203469. DOI 10.1155/2018/7203469.
- Shulga O.A., Shchennikova A.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. Transcriptome-wide characterization of the MADS-box family in Pinesap *Monotropa hypopitys* reveals flowering conservation in non-photosynthetic myco-heterotrophs. J. Plant Growth Regul. 2018;37:768-783. DOI 10.1007/s00344-017-9772-9.
- Siegfried K.R., Eshed Y., Baum S.F., Otsuga D., Drews G.N., Bowman J.L. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. Development. 1999;126(18):4117-4128.
- Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. Curr. Biol. 2009;19(11):909-914. DOI 10.1016/j.cub.2009.03.060.
- Stahle M.I., Kuehlich J., Staron L., von Arnim A.G., Golz J.F. *YABBYs* and the transcriptional corepressors LEUNIG and LEUNIG_HOMOLOG maintain leaf polarity and meristem activity in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2009;21(10):3105-3118. DOI 10.1105/tpc.109.070458.
- Stewart W.N., Rothwell G.W. Paleobotany and the Evolution of Plants. 2nd ed., Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- Strable J., Wallace J.G., Unger-Wallace E., Briggs S., Bradbury P.J., Buckler E.S., Vollbrecht E. Maize *YABBY* genes *drooping leaf1* and *drooping leaf2* regulate plant architecture. Plant Cell. 2017;29(7):1622-1641. DOI 10.1105/tpc.16.00477.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tononi P., Möller M., Bencivenga S., Spada A. *GRAMINIFOLIA* homolog expression in *Streptocarpus rexii* is associated with the basal meristems in phyllocladophytes, a morphological novelty in *Gesneriaceae*. Evol. Dev. 2010;12(1):61-73. DOI 10.1111/j.1525-142X.2009.00391.x.
- Wallace G.D. Studies of the Monotropoidiae (Ericaceae): taxonomy and distribution. Wassman J. Biol. 1975;33:1-88.
- Wicke S., Muller K.F., dePamphilis C.W., Quandt D., Bellot S., Schneeweiss G.M. Mechanistic model of evolutionary rate variation en route to a nonphotosynthetic lifestyle in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016;113:9045-9050. DOI 10.1073/pnas.1607576113.
- Yamada T., Yokota S., Hirayama Y., Imaichi R., Kato M., Gasser C.S. Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of *YABBY* genes in angiosperms. Plant J. 2011;67(1):26-36. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2011.04570.x.
- Zhang H., Zhou C. Signal transduction in leaf senescence. Plant Mol. Biol. 2013;82(6):539-545. DOI 10.1007/s11103-012-9980-4.
- Zhang X.L., Yang Z.P., Zhang J., Zhang L.G. Ectopic expression of BraYAB1-702, a member of *YABBY* gene family in Chinese cabbage, causes leaf curling, inhibition of development of shoot apical meristem and flowering stage delaying in *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Mol. Sci. 2013;14(7):14872-14891. DOI 10.3390/ijms140714872.
- Zhao W., Su H.Y., Song J., Zhao X.Y., Zhang X.S. Ectopic expression of *TaYAB1*, a member of *YABBY* gene family in wheat, causes the partial abaxialization of the adaxial epidermises of leaves and arrests the development of shoot apical meristem in *Arabidopsis*. Plant Sci. 2006;170(2):364-371. DOI 10.1016/j.plantsci.2005.09.008.
- Zuckerkindl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Eds. V. Bryson, H.J. Vogel. Evolving Genes and Proteins. New York: Acad. Press, 1965;97-166. DOI 10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6.

ORCID ID

A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
A.M. Kamionskaya orcid.org/0000-0001-9815-9578
A.V. Nezhdanova orcid.org/0000-0003-4175-3175
K.S. Gavrilova orcid.org/0000-0001-8207-3622
M.A. Filyushin orcid.org/0000-0003-3668-7601
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765
K.G. Skryabin orcid.org/0000-0001-6642-4410

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-24-00175 («Геномный анализ как основа изучения механизмов эволюционной адаптации») и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (А.В. Нежданова, К.С. Гаврилова) и с использованием экспериментальной установки искусственного климата (Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.09.2018. После доработки 30.11.2018. Принята к публикации 05.12.2018.

Спорофитный тип восстановления фертильности в ЦМС-индуцирующей цитоплазме сорго типа A_3 и его модификация условиями влагообеспеченности растений

Л.А. Эльконин , В.В. Кожемякин, М.И. Цветова

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия

 e-mail: lelkonin@gmail.com

A_3 -тип ЦМС сорго – один из самых трудных для восстановления фертильности вследствие низкой частоты встречаемости генов-восстановителей, сложного механизма восстановления фертильности, происходящего при комплементарном взаимодействии двух гаметофитных генов, *Rf3* и *Rf4*, чувствительности их экспрессии к воздушной и почвенной засухе. С целью проверки гипотезы о спорофитном типе восстановления фертильности у созданных нами ЦМС-линий на основе цитоплазмы типа A_3 анализировали расщепление в самоопыленном потомстве фертильных гибридов F_1 , выращенных при разных режимах влагообеспеченности (на делянках с засушливым фоном, с влагообеспеченным фоном, в климатической камере и на опытном поле при естественном режиме влагообеспеченности). Присутствие стерильных растений в семьях F_2 и BC_1 с материнской ЦМС-линией, выращенных при всех испытанных режимах влагообеспеченности, свидетельствует в пользу спорофитного механизма восстановления фертильности. Цитологический анализ фертильных гибридов F_1 выявил значительное число дегенерирующих пыльцевых зерен (ПЗ) с нарушением накопления крахмала, отрывом содержимого ПЗ от клеточной стенки. Предполагается, что у гибридов с изученными ЦМС-линиями гены-восстановители *Rf3* и *Rf4* начинают функционировать уже в тканях спорофита, нормализуя развитие некоторой части ПЗ, несущих рецессивные аллели генов *rf3* и *rf4*, которые участвуют в оплодотворении и дают начало стерильным генотипам в семьях F_2 и в BC_1 . Впервые обнаружено трансгенерационное влияние условий влагообеспеченности растений линии-восстановителя на характер расщепления по мужской фертильности в поколении F_2 : опылитель, выращенный в грядке с дополнительным поливом, давал больше фертильных и меньше стерильных индивидов по сравнению с опылителем, выращенным в «засушнике» ($p < 0.01$). При этом характер расщепления изменялся с дигенного на моногенный, свидетельствуя о наследуемом ингибировании экспрессии одного из генов-восстановителей (своеобразный «эффект дедушки»). Показана возможность отбора на устойчивость системы восстановления фертильности в цитоплазме A_3 к функционированию в условиях дефицита влажности воздуха в период цветения, что может способствовать созданию новых восстановителей фертильности этого типа ЦМС. Ключевые слова: *Sorghum bicolor* (L.) Moench; цитоплазматическая мужская стерильность; цитоплазма A_3 ; гены-восстановители фертильности; эпигенетика; трансгенерационное наследование; засуха; дефицит влажности воздуха.

Для цитирования: Эльконин Л.А., Кожемякин В.В., Цветова М.И. Спорофитный тип восстановления фертильности в ЦМС-индуцирующей цитоплазме сорго типа A_3 и его модификация условиями влагообеспеченности растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):412-421. DOI 10.18699/VJ19.510

The sporophytic type of fertility restoration in the A_3 CMS-inducing cytoplasm of sorghum and its modification by plant water availability conditions

L.A. Elkonin , V.V. Kozhemyakin, M.I. Tsvetova

Agricultural Research Institute for South-East Region, Saratov, Russia

 e-mail: lelkonin@gmail.com

The A_3 type of CMS in sorghum is one of the most difficult to restore fertility because of the low frequency of fertility-restoring genes among sorghum accessions, the complex mechanism of fertility restoration that occurs with the complementary interaction of two gametophytic genes *Rf3* and *Rf4*, and the sensitivity of their expression to air and soil drought. In order to test the hypothesis of the sporophytic type of fertility restoration in CMS lines with A_3 type cytoplasm developed in our laboratory, we analyzed segregation in the self-pollinated progeny of fertile F_1 hybrids grown under different water availability conditions (in a dryland plot, in plots with additional irrigation, in a growth chamber, and in an experimental field with a natural precipitation regime) and in their backcrosses to the maternal CMS line. The presence of sterile plants in the F_2 and BC_1 families with the maternal CMS line grown in all tested water availability conditions argues for the sporophytic mechanism of fertility restoration. Cytological analysis of fertile F_1 hybrids revealed a significant amount of degenerating pollen grains (PGs) with impaired starch accumulation and detachment of the PG

contents from the cell wall. It is assumed that the expression of the fertility-restoring genes *Rf3* and *Rf4* in the hybrids with studied CMS lines starts already in the sporophyte tissues, normalizing the development of a certain part of the PGs carrying the recessive alleles of these genes (*rf3* and *rf4*), which are involved in fertilization and give rise to sterile genotypes found in F_2 and BC_1 families. For the first time, the transgenerational effect of water availability conditions of growing a fertility-restoring line on male fertility of the F_2 generation was detected: a pollinator grown in a plot with additional irrigation produced more fertile and less sterile individuals compared to the same pollinator grown under a rainfall shelter ($p < 0.01$), and the segregation pattern changed from digenic to monogenic, indicating heritable inhibition of the expression of one of the fertility-restoring genes (kind of "grandfather effect"). The possibility of selection for the stability of the fertility restoration system of the A_3 cytoplasm to functioning under conditions of high vapor pressure deficit during the flowering period was shown. These data may contribute to the creation of effective fertility restoring lines for this type of CMS in sorghum.

Key words: *Sorghum bicolor* (L.) Moench; cytoplasmic male sterility; A_3 cytoplasm; fertility-restoring genes; epigenetics; transgenerational inheritance; drought; vapor pressure deficit.

For citation: Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Tsvetova M.I. The sporophytic type of fertility restoration in the A_3 CMS-inducing cytoplasm of sorghum and its modification by plant water availability conditions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):412-421. DOI 10.18699/VJ19.510 (in Russian)

Введение

Развитие генеративной сферы растений – наиболее чувствительная к действию факторов внешней среды стадия онтогенеза. Одна из причин, обуславливающих такую чувствительность, – высокая энергоёмкость процессов мейоза, споро- и гаметогенеза (Dolferus et al., 2013). Как известно, энергетические потребности растения обеспечиваются митохондриом растительной клетки. В то же время митохондрии являются первичными мишенями экологических стрессов, которые нарушают их функционирование и информационный обмен между митохондриальным и ядерным геномами (Atkin, Macherel, 2009; Jacoby et al., 2012; Ng et al., 2014; Liberatore et al., 2016). Этот факт имеет особое значение для гибридов с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), возникающих в результате отдаленной гибридизации, у которых нарушен информационный обмен между ядерным и митохондриальным геномами, установленный в процессе эволюции (Touzet, Meyer, 2014), и снижена устойчивость к стрессовым факторам внешней среды (Li et al., 2012).

Среди разных типов стерильных цитоплазм, выявленных у сорго (Reddy et al., 2005), цитоплазма A_3 , источником которой служит линия IS1112C, – одна из самых трудных для восстановления фертильности. Эти трудности обусловлены низкой частотой встречаемости генов-восстановителей фертильности (Worstell et al., 1984; Torres-Cardona et al., 1990; Dahlberg, Madera-Torres, 1997) и чувствительностью их экспрессии к воздушной и почвенной засухе (Kozhemyakin et al., 2017). Генетический анализ восстановления фертильности, выполненный на гибридных комбинациях между ЦМС-линиями с цитоплазмой A_3 селекции Техасской сельскохозяйственной экспериментальной станции (США) и IS1112C, свидетельствовал о функционировании дигенной гаметофитной системы восстановления фертильности, в которой комплементарное взаимодействие двух генов (*Rf3* и *Rf4*) необходимо для формирования жизнеспособной пыльцы (Tang et al., 1998; Pring et al., 1999). Гибриды F_1 с восстановленной мужской фертильностью, гетерозиготные по генам *Rf3* или *Rf4*, дают 25 % фертильной пыльцы, что снижает завязываемость семян и ограничивает практическое использование цитоплазмы A_3 в селекции сорго по сравнению с другими типами стерильных цитоплазм

(A_1 , A_2), обеспечивающими 100 % завязываемость зерна у гибридов F_1 .

Позднее у образцов суданской травы была обнаружена спорофитная система восстановления фертильности ЦМС A_3 (Tang et al., 2007). Эти две системы восстановления фертильности, как известно, имеют принципиальные различия (Chase, Gabay-Laughnan, 2004). При спорофитной системе восстановления фертильности, характерной для большинства типов ЦМС, ген-восстановитель, функционируя в тканях пыльника (спорофита), препятствует дегенерации пыльцевых зерен (ПЗ) после мейоза, характерной для большинства типов ЦМС (Kaul, 1988). В результате в пыльниках гибридов, гетерозиготных по генам восстановителям (*Rf/rf*), формируются ПЗ, несущие ген-восстановитель фертильности (*Rf*), и ПЗ, несущие его рецессивный аллель (*rf*), не обладающий восстановительной способностью. Поэтому в самоопыленном потомстве таких гибридов (F_2), как и в беккроссах с материнской ЦМС-линией (*rf/rf*), присутствуют стерильные растения. При гаметофитной системе восстановления фертильности ген-восстановитель функционирует в мужских гаметофитах – развивающихся ПЗ. В связи с этим в пыльниках гибридов, гетерозиготных по генам-восстановителям (*Rf/rf*), присутствуют как фертильные ПЗ, несущие ген *Rf*, так и стерильные ПЗ, дегенерировавшие в результате отсутствия у них гена-восстановителя. Следовательно, в самоопыленном потомстве таких гибридов, так же, как в их беккроссе с материнской ЦМС-линией, стерильные растения отсутствуют, а присутствуют только растения с полным восстановлением мужской фертильности (*Rf/Rf*) и полустерильные индивидуумы (*Rf/rf*), возникающие за счет передачи аллеля *rf* через яйцеклетки.

Ранее нами было показано, что дефицит влажности воздуха в период цветения отрицательно коррелирует с уровнем фертильности гибридов F_1 в цитоплазме A_3 , тогда как выращивание гибридных популяций в условиях искусственного полива способствовало отбору линий-восстановителей фертильности этого типа ЦМС (Kozhemyakin et al., 2017). Присутствие значительного числа стерильных растений в семьях F_2 формально свидетельствовало в пользу спорофитного типа восстановления мужской фертильности у гибридов F_1 , однако тщательный анализ показал, что стерильные растения цвели в дни с

максимальным дефицитом влажности воздуха, который мог быть причиной их стерильного фенотипа.

Целью экспериментов, изложенных в данной работе, являлась проверка гипотез о спорофитном типе восстановления фертильности ЦМС А₃ под действием генов *Rf3* и *Rf4*, известных как гаметофитные гены-восстановители, а также о трансгенерационном влиянии условий влагообеспеченности на экспрессию мужской фертильности в потомстве гибридов F₁. Кроме того, впервые приводятся данные об эффективности отбора на устойчивое функционирование системы восстановления мужской фертильности в цитоплазме А₃ в условиях воздушной засухи в фазу цветения.

Материалы и методы

В работе исследовали гибридные популяции F₁–F₃, полученные от скрещивания созданных нами ранее ЦМС-линий А₃ КП-70 и А₃ Топаз с линией-восстановителем фертильности А₃-типа ЦМС – КВВ-96. ЦМС-линии были получены с помощью насыщающих беккроссов фертильных линий КП-70 и Топаз на выведенную нами ранее ЦМС-линию А₃ Карликовое белое, для которой донором стерильной цитоплазмы служила линия А₃ Тх398. Эта линия имеет генотип *rf3rf3rf4rf4* (Tang et al., 1998). Линия КВВ-96 была получена нами в результате отбора из гибридной комбинации А₃ Карликовое белое/IS1112С (Kozhemyakin et al., 2017), в которой в качестве донора генов-восстановителей использовалась линия IS1112С. Линия IS1112С имеет А₃ тип цитоплазмы и является донором генов *Rf3* и *Rf4* (Pring et al., 1999; Kulhman et al., 2006).

ЦМС-линии, линии-восстановители и гибридные популяции выращивали на опытном поле Селекционного комплекса ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока», г. Саратов, (51°32' с.ш., 46°02' в.д.) в 2016–2018 гг. Посев производили в третьей декаде мая. Растения выращивали в 4-метровых рядах с междурядьем 70 см и расстоянием между растениями 12–15 см с использованием стандартной агротехники, принятой для выращивания зернового сорго.

Агроклиматические условия вегетации растений варьировали по годам (табл. 1). Сезон 2016 г. отличался засушливыми условиями: в каждый календарный месяц в период вегетации (июнь–август) среднесуточная температура была выше среднегодовых значений на 1.6–4.8 °С, а сумма осадков была меньше в три раза (гидро-термический коэффициент, ГТК = 0.02). Сезон 2017 г.

характеризовался значительным избытком атмосферных осадков в первой половине вегетации растений (от появления всходов до начала цветения), при этом в июне, в фазу трубкования, значения среднесуточной температуры были ниже среднегодовых. В 2018 г. первая половина вегетации, до начала цветения, протекала в засушливых условиях, тогда как во второй половине вегетации, начиная с середины июля (в период цветения сорго), наблюдалось выпадение значительного количества осадков.

Для изучения влияния условий влагообеспеченности на проявление мужской фертильности и характера наследования восстановительной способности использовали делянки с разными селективными фонами: с дополнительным поливом (два раза в неделю по 7–8 л/м², начиная с фазы трубкования до завершения цветения) (влагообеспеченный фон) и без полива (засушливый фон). Для получения засушливого фона делянку перед началом фазы трубкования накрывали конструкцией, изготовленной из светопрозрачного поликарбоната, предотвращавшей попадание на делянку атмосферных осадков.

Использованные в работе гибриды F₁ были получены путем индивидуальных скрещиваний растений линии КВВ-96, выращиваемых в засушливом фоне и на влагообеспеченном фоне (с каждого фона по два опылителя), с растениями ЦМС-линии А₃ КП-70, выращиваемыми в опытном поле при естественном режиме влагообеспеченности. Гибриды F₁, полученные от индивидуальных скрещиваний, выращивали в 2016–2018 гг. на делянках с засушливым и влагообеспеченным фоном (четыре гибридные комбинации на каждом фоне). В качестве контроля для оценки влияния селективных фонов на фертильность растений в каждой из делянок анализировали потомство четырех отцовских растений-опылителей.

Семьи F₂, полученные от индивидуальных самоопыленных гибридов F₁ с разных селективных фонов, и ВС₁, полученные от скрещивания гибридов F₁ с ЦМС-линией А₃КП-70, выращивали в 2017–2018 гг. на опытном поле при естественном режиме влагообеспеченности. Некоторые семьи F₂ дополнительно выращивали на делянке с влагообеспеченным фоном. Одну из гибридных популяций F₂ (А₃ Топаз/КВВ-96) выращивали в климатической камере LGC-4203 (Daihan, Корея) при фотопериоде 14 ч день/10 ч ночь, относительной влажности воздуха 70 % и температуре 28 °С день/24 °С ночь.

Для определения уровня мужской фертильности все растения перед цветением изолировали пергаментными

Таблица 1. Агроклиматические условия в период проведения экспериментов¹

Месяц	Показатель											
	Температура воздуха, °С				Относительная влажность, %				Осадки, мм			
	Средняя многолетняя	2016 г.	2017 г.	2018 г.	Средняя многолетняя	2016 г.	2017 г.	2018 г.	Средняя многолетняя	2016 г.	2017 г.	2018 г.
Май	15.0	16.1	14.0	18.3	52	62.9	57.5	50.0	43	77.2	99.3	28.1
Июнь	19.4	21.0	18.0	19.9	54	52.8	60.7	46.9	45	9.0	66.7	14.1
Июль	21.4	23.6	21.8	22.8	56	53.9	62.1	60.2	51	28.8	51.3	88.7
Август	19.9	24.7	22.8	23.7	58	48.6	58.0	51.2	44	8.3	9.1	4.4

¹ По данным лаборатории гидрометеорологии НИИСХ Юго-Востока (г. Саратов).

изоляторами. В зависимости от уровня завязываемости семян растения классифицировали как стерильные (с) (0 % семян), полустерильные (пс) (< 40 %, как правило, 10–20 %), ф – фертильные (> 40 %, как правило, 80–100 %).

Для цитологического анализа пыльцы веточки с разных частей метелок гибридов F_1 и потомства растений-опылителей фиксировали в ацетоалкоголе (1:3), дважды промывали и хранили в 75 % спирте при температуре 4–6 °С. Препараты готовили из смеси пыльников, извлеченных из 10–15 зафиксированных веточек индивидуальных растений. Пыльцу окрашивали 1 % раствором йода в йодистом калии. У каждого растения отдельно анализировали пыльцу из гермафродитных и мужских цветков. В каждом препарате подсчитывали по 100 пыльцевых зерен в четырех повторениях. Всего на каждом селективном фоне было изучено по 15–17 растений F_1 и столько же индивидуумов из потомства отцовских растений-опылителей.

Показатели дефицита влажности воздуха в фазу цветения были предоставлены лабораторией гидрометеорологии ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока». При этом для каждого растения вычисляли индивидуальный показатель, представлявший собой среднюю величину из суммы показателей за пять дней до начала цветения верхушки метелки и пять дней после начала цветения.

Статистический анализ расщеплений в популяциях F_2 и BC_1 проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность, а также прямого теста Фишера (McDonald, 2014), при этом осуществляли проверку гипотез моно- и дигенного контроля. Значимость различия уровня фертильности в разных опытных вариантах выявляли с помощью дисперсионного анализа с использованием пакета программ AGROS, версия 2.09 (С.П. Мартынов, Институт общей генетики РАН). Различия количества фертильных и стерильных растений в семьях, выращенных при разных режимах влагообеспеченности, оценивали с помощью сравнения долей по методу Фишера (Зайцев, 1984).

Результаты

Влияние стресса засухи на восстановление фертильности у гибридов F_1 . Анализ завязываемости семян у гибридов F_1 $\text{♀}A_3$ КП-70 $\times$ ♂ КВВ-96, выращенных при разных режимах влагообеспеченности, показывает, что линия КВВ-96 обладает способностью к восстановлению фертильности ЦМС типа A_3 (табл. 2). Однако в условиях засухи доля фертильных растений среди гибридов F_1 значительно снижается, а доля полустерильных растений возрастает по сравнению с влагообеспеченным фоном. Эти данные свидетельствуют, что условия влагообеспеченности растений регулируют экспрессию генов-восстановителей линии КВВ-96, что необходимо учитывать при анализе расщеплений в семьях F_2 и BC_1F_1 .

Спорофитный тип восстановления мужской фертильности в ЦМС A_3 . В соответствии с гипотезой о гаметофитной природе восстановления мужской фертильности в ЦМС-индуцирующей цитоплазме A_3 двумя генами-восстановителями фертильности (Tang et al., 1998; Pring et al., 1999) гибриды F_1 , полученные от скрещивания ЦМС-линий ($rf3rf3rf4rf4$) с линией IS1112c ($Rf3Rf3Rf4Rf4$), имеют генотип $Rf3rf3Rf4rf4$. В результате мейоза у таких

Таблица 2. Характеристика мужской фертильности гибридов F_1 сорго $\text{♀}A_3$ КП-70 $\times$ ♂ КВВ-96, выращенных при разных режимах влагообеспеченности (2016 г.)

Фон влагообеспеченности	Доля растений (%) с уровнем фертильности ^а		
	ф	пс	с
Делянка с поливом	98.0 a	1.3	0.7
Засушливая делянка	76.9 b	16.9	6.2
F	36.05**	8.80	4.18

Примечание. ^а – средние от четырех повторностей; ф – фертильные (завязываемость семян > 40 %, как правило, 80–100 %), пс – полустерильные (< 40 %, как правило, 10–20 %), с – стерильные растения (0 % семян); данные, обозначенные разными буквами, значительно различаются при $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

гибридов формируются четыре класса гамет ($Rf3Rf4$, $Rf3rf4$, $rf3Rf4$, $rf3rf4$), при этом только пыльцевые зерна, имеющие генотип $Rf3Rf4$, оказываются фертильными, тогда как пыльцевые зерна с другими генотипами дегенерируют. В связи с этим в поколении F_2 должны присутствовать только растения с восстановленной мужской фертильностью, поскольку участвующие в оплодотворении пыльцевые зерна несут гены-восстановители фертильности. Аналогичным образом в беккроссе гибрида F_1 с материнской ЦМС-линией должны присутствовать только растения с восстановленной мужской фертильностью ($Rf3rf3Rf4rf4$).

Однако в наших экспериментах в семьях F_2 , полученных от скрещивания ЦМС-линий на цитоплазме A_3 с линией КВВ-96, созданной на основе линии IS1112C, в разных условиях внешней среды (на делянках с влагообеспеченным фоном, при естественном режиме влагообеспеченности на опытном поле, в климатической камере) регулярно наблюдались растения с мужской стерильностью. Наиболее показательны данные, полученные при анализе расщеплений на делянке с влагообеспеченным фоном и в климатической камере с высокой относительной влажностью воздуха (70 %), поскольку в таких условиях отсутствует воздействие засухи, которая препятствует восстановлению фертильности в A_3 -типе ЦМС (Kozhemyakin et al., 2017).

Так, в 2016 г. (см. табл. 3) на делянке с влагообеспеченным фоном соотношение растений с восстановленной фертильностью (ф+пс) и стерильных растений (с) соответствовало дигенному расщеплению 15:1 либо 12ф:3пс:1с при выделении в отдельный класс растений с неполной экспрессией мужской фертильности. Такое расщепление свидетельствовало, что восстановление фертильности в условиях влагообеспеченного фона контролируется двумя генами-восстановителями фертильности. При выращивании этой же семьи F_2 в засушливом фоне соотношение растений с полностью или частично восстановленной фертильностью и стерильных растений отличалось от дигенных типов расщепления, но соответствовало моногенному расщеплению 3:1 (табл. 3), которое указывало на ингибирование экспрессии одного из генов-восстановителей в условиях засухи. Причины,

Таблица 3. Расщепление в поколении F₂ гибрида ♀A₃ Топаз × ♂KBB-96 в разных условиях внешней среды, 2016 г.

Фон влагообеспеченности	Число растений			Соотношение	χ^2	p
	ф	пс	с			
Влагообеспеченный	35	9	4	15(ф+пс):1с	0.154	0.694
				12ф:3пс:1с	0.157	0.924
Засушливый	27	18	18	3(ф+пс):1с	0.161	0.688
Климатическая камера	11	9	4	3(ф+пс):1с	0.505	0.477

Таблица 4. Расщепление по фертильности растений в поколении F₂ гибридов ♀A₃ КП-70 × ♂KBB-96 и в BC₁F₁ с материнской ЦМС-линией при выращивании в грядке с дополнительным поливом, 2017 г.^a

Гибридная комбинация	Число растений, шт.			Соотношение	χ^2	p
	ф	пс	с			
F ₂ (♀A ₃ КП-70 × ♂KBB-96-1)	71	10	4	12ф:3пс:1с	1.859	0.395
F ₂ (♀A ₃ КП-70 × ♂KBB-96-5)	74	21	3	12ф:3пс:1с	1.231	0.540
BC ₁ [♀A ₃ КП-70 × (♀A ₃ КП-70 × ♂KBB-96-1)]	7	23	1 ^b			
BC ₁ [♀A ₃ КП-70 × (♀A ₃ КП-70 × ♂KBB-96-5)]	6	26	3 ^b			

Примечание. ^a – усредненные показатели дефицита влажности воздуха в период цветения: среднесуточный – 15.1 гПа; максимальный – 31.2 гПа; ^b – при переносе в климатическую камеру развивались метелки с 30 % завязываемостью семян; ^в – 1 % завязывания семян.

обусловившие расщепление 3:1 в условиях климатической камеры, не ясны. Возможно, при большем размере выборки характер расщепления в климатической камере был бы иным.

В сезоне 2017 г. изучали расщепление в потомстве гибридов F₁ ♀A₃ КП-70 × ♂KBB-96, при этом размер популяций F₂, выращиваемых на влагообеспеченном фоне, был увеличен. Вновь, как и в потомстве гибридов F₁ ♀A₃ Топаз × ♂KBB-96, в семьях F₂ присутствовали стерильные растения, что свидетельствовало в пользу спорофитного типа восстановления фертильности. Соотношение фертильных, полустерильных и стерильных индивидов соответствовало дигенному расщеплению 12:3:1 (табл. 4). Примечательно, что стерильные растения из семей F₂, перенесенные из делянки с дополнительным поливом в климатическую камеру с 70 % относительной влажностью воздуха, формировали мужски-стерильные метелки. Этот факт свидетельствовал, что мужская стерильность таких растений обусловлена генотипом, но не дефицитом влажности воздуха во время цветения. В семьях BC₁F₁, полученных при опылении материнской ЦМС-линии пыльцой гибридов F₁, стерильные растения, однако, отсутствовали (см. табл. 4).

Причины расхождения результатов расщепления в F₂ и BC₁ не ясны. Возможно, они связаны с различиями в функционировании систем восстановления фертильности у растений BC₁ и F₂ или с гаметным отбором у растений F₁, поскольку для получения BC₁ была использована пыльца с метелок побегов кушения, тогда как расщепление в F₂ анализировали в потомстве метелок с главного стебля. При этом среднесуточный дефицит влажности воздуха при цветении метелок побегов кушения был 15.8 гПа, тогда как при цветении главных побегов – 24.9 гПа. Возможно, дефицит влажности воздуха является фактором,

влияющим на функционирование гаметофитных генов-восстановителей фертильности и тем самым способствующим селекции тех или иных классов пыльцевых зерен.

В сезоне 2018 г. анализировали семьи F₂, полученные от гибридов F₁, выращенных в условиях влагообеспеченного и засушливого фона, при этом анализируемые популяции выращивали в условиях опытного поля и влагообеспеченного фона. Во всех анализируемых семьях присутствовало значительное число стерильных и полустерильных растений (табл. 5), однако при анализе наблюдавшихся расщеплений учитывали только стерильные растения, которые цвели в те же дни, что и фертильные растения, и, следовательно, их стерильность была обусловлена дефицитом влажности воздуха, а генотипом.

В семьях F₂, выращенных на влагообеспеченном фоне, соотношение фертильных, полустерильных и стерильных растений соответствовало дигенному расщеплению 9ф:6пс:1с. Возможно, в условиях 2018 г. фертильными оказывались только растения, в генотипе которых присутствовали оба гена-восстановителя (с генотипом *Rf3-Rf4*), тогда как растения, в генотипе которых был только один доминантный ген (*Rf3* или *Rf4*), имели полустерильный фенотип. В BC₁ соотношение растений с частичным восстановлением фертильности и стерильных растений соответствовало расщеплению 3пс:1с (см. табл. 5), которое должно было наблюдаться при наличии четырех классов мужских гамет (*Rf3Rf4*; *rf3Rf4*; *Rf3rf4*; *rf3rf4*) у дигетерозиготных отцовских растений – гибридов F₁, которые скрещивали с растениями ЦМС-линии (*rf3rf3rf4rf4*). Эти данные подтверждают спорофитный тип восстановления фертильности у гибридов F₁.

Примечательно, что при выращивании в полевых условиях в семьях F₂, полученных от гибридов F₁, созданных с участием отцовских родителей, выращенных в

Таблица 5. Характеристика мужской фертильности растений в гибридных комбинациях на цитоплазме А₃ в 2018 г.^а

Гибридная комбинация	Покое- ние	Условия выращивания ^б			Число растений			Соотно- шение	χ^2	<i>p</i>
		♂	F ₁	F ₂ (BC ₁)	ф	пс	с			
♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-1 зас	F ₂	Зас	Зас	Вл	42	25	7	9ф:6пс:1с	0.943	0.624
♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-2 вл	F ₂	Вл	Вл	Вл	44	27	2	9ф:6пс:1с	–	0.707
♀ А ₃ КП-70 × ♂ (А ₃ КП-70/КВВ-96-2 вл)	BC ₁	Вл	Вл	Вл	–	23	8	3пс:1с	0.011	0.916
♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-1 зас	F ₂	Зас	Вл	Поле	29 (42.0 %)	23	17 (24.6 %)	9ф:6пс:1с	40.13	0.0
								3(ф+пс):1с	0.005	0.944
♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-2 вл	F ₂	Вл	Вл	Поле	51 (54.3 %)	34	9 (9.6 %)*	9ф:6пс:1с	1.225	0.542
♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-1 зас	F ₂	Зас	Зас	Поле	18 (26.5 %)	35	15 (22.1 %)	9ф:6пс:1с	41.451	0.0
								3(ф+пс):1с	0.176	0.675
♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-2 вл	F ₂	Вл	Зас	Поле	49 (51.6 %)**	35	11 (11.6 %)	9ф:6пс:1с	3.796	0.150
Всего по (♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-1 зас)	F ₂	Зас		Поле	47 (34.3 %)	58	32 (23.4 %)			
Всего по (♀ А ₃ КП-70 × ♂ КВВ-96-2 вл)	F ₂	Вл		Поле	93 (53.1 %)**	62	20 (11.4 %)**			

Примечание. ^а – усредненные показатели дефицита влажности воздуха в период цветения: среднесуточный – 10.1 гПа; максимальный – 19.5 гПа; ^б – зас – засушливый фон; вл – влагообеспеченный фон (делянка с дополнительным поливом); *, ** – отличается от доли растений аналогичного класса фертильности в потомстве, полученном при использовании опылителя, выращенного в засушливом фоне, соответственно, на первом или втором уровне значимости ($p < 0.05$ или $p < 0.01$).

засушливом фоне (КВВ-96-♂1зас), характер расщепления отклонялся от дигибридного (9:6:1) и соответствовал моногенному расщеплению 3:1, показывая, что один из генов-восстановителей отцовского родителя не функционирует в этих семьях (см. табл. 5).

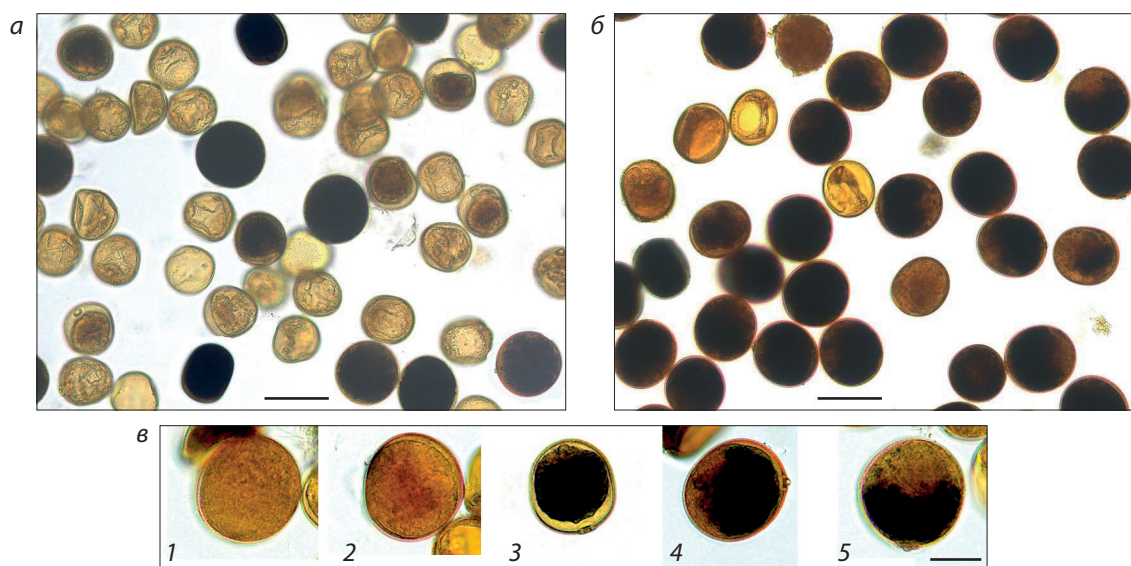
Детальный анализ характера экспрессии мужской фертильности у растений в поколении F₂ показал, что условия выращивания гибридов F₁ не влияют на характер расщепления в F₂. Однако условия выращивания линии-опылителя (донора генов *Rf*) меняли характер расщепления в потомстве гибридов F₁ (см. табл. 5). В семьях F₂, полученных при использовании в качестве донора генов *Rf* опылителя из засушливого фона (КВВ-96-♂1зас), доля стерильных растений была значимо выше ($p < 0.01$), а доля фертильных растений ниже ($p < 0.01$), чем при использовании в качестве донора генов *Rf* опылителя, выращенного на влагообеспеченном фоне (КВВ-96-♂2вл). В результате в семьях F₂, полученных на основе донора генов *Rf* из влагообеспеченного фона, наблюдалось дигибридное расщепление 9:6:1, тогда как в семьях, полученных на основе донора генов *Rf* из засушливого фона, соотношение индивидуумов с восстановленной фертильностью соответствовало моногенному расщеплению 3:1. Этот результат, возможно, указывал на ингибирование под влиянием засухи одного из генов *Rf* у растения-донора пыльцы, выращенного в условиях «засушника», которое носит наследуемый (трансгенерационный) характер. Такой эффект наследовался в течение двух поколений. Однако при выращивании семьи F₂, полученной на основе донора генов *Rf* из засушливого фона (КВВ-96-♂1зас), на влагообеспеченном фоне (см. табл. 5, первая строка), расщепление в ней соответствовало соотношению 9:6:1. Этот факт свидетельствует об обратимости индуцирован-

ного засухой ингибирования экспрессии гена-восстановителя фертильности с помощью повышенного уровня влагообеспеченности растений. Эти данные, по-видимому, являются примером трансгенерационного влияния условий выращивания донора генов *Rf* на характер экспрессии этих генов в поколении F₂.

Цитологический анализ пыльцы гибридов F₁. С учетом того, что при спорофитном типе восстановления фертильности пыльца у гибридов F₁ содержит преимущественно фертильные ПЗ, тогда как при гаметофитном восстановлении фертильности должно наблюдаться расщепление по типам ПЗ (фертильные: стерильные), нами был проведен цитологический анализ пыльцы гибридов F₁ ♀ А₃ КП-70 × ♂ КВВ-96. Было обнаружено, что в пыльниках фертильных гибридов присутствует значительное количество стерильных ПЗ, причем доля фертильных ПЗ, полностью лишенных признаков дегенерации, была низкой (3–7 %) и не соответствовала 25 %, которые следовало ожидать, исходя из литературных данных (Pring et al., 1999) (табл. 6). Значительная часть ПЗ, выглядевших как фертильные на малом увеличении, при детальном исследовании на больших увеличениях имела нарушения накопления крахмала, отрыв содержимого ПЗ от клеточной стенки (рисунок). Кроме того, наблюдались ПЗ с изменением окраски крахмала, обусловленным, по-видимому, замещением амилозы амилопектином. Однако, если предполагать, что эти нарушения не оказывают влияния на способность ПЗ к оплодотворению, то соотношение совокупности всех «фертильных» и стерильных ПЗ действительно соответствовало расщеплению 1:3 у растений из влагообеспеченного фона № 161-1 ($\chi^2 = 1.08$, $p = 0.299$) и № 165-2 ($\chi^2 = 0.013$, $p = 0.909$), тогда как у одного из растений из засушливого фона доля фертильной

Таблица 6. Результаты цитологического анализа пыльцы, сформировавшейся в гермафродитных цветках, у гибридов F_1 сорго с ЦМС A_3 -типа и у растений линии-опылителя с тем же типом цитоплазмы, выращенных в засушливом и влагообеспеченном (на делянке с дополнительным поливом) фонах (2017 г.)

Растение, уровень завязываемости	Кол-во пыльцевых зерен, %		
	фертильных		стерильных
	Всего	В том числе без признаков дегенерации	
Влагообеспеченный фон			
KBB-96 (100 %)	75.2±2.4	42.3±7.5	24.5±4.0
161-1 (F ₁ A ₃ КП-70/KBB-96), 70 %	30.2±3.6	2.7±1.1	69.8±3.6
165-2 (F ₁ A ₃ КП-70/KBB-96), 100 %	26.0±1.1	5.0±0.5	74.0±1.1
Засушливый фон			
KBB-96 (60 %)	80.7±3.7	31.3±3.3	20.2±4.0
KBB-96 (40 %)	75.4±2.4	18.5±2.6	24.5±4.0
161-9 (F ₁ A ₃ КП-70/KBB-96), 100 %	29.0±3.4	10.0±2.1	71.0±3.4
165-9 (F ₁ A ₃ КП-70/KBB-96), 90 %	39.2±2.3	4.0±0.4	60.8±2.3
167-7 (F ₁ A ₃ КП-70/KBB-96), 100 %	32.2±1.4	3.2±1.2	67.8±1.3



Пыльца фертильных гибридов F_1 A_3 КП-70 × σ KBB-96 (а) и линии-восстановителя фертильности KBB-96 (б), шкала 50 мкм; в – разные типы пыльцевых зерен (ПЗ): 1, 2 – изменение окраски крахмала, 2–4 – отрыв содержимого ПЗ от клеточной стенки, 4, 5 – нарушение накопления крахмала; шкала 20 мкм.

пыльцы была выше и соответствие соотношению 1:3 отсутствовало (№ 165-9: $\chi^2 = 9.72$, $p < 0.01$).

Эти данные означают, что в условиях засушливого фона могли развиваться не только ПЗ, содержащие оба доминантных гена, $Rf3$ и $Rf4$, но и ПЗ, содержащие рецессивные аллели этих генов. Значительные отклонения от ожидаемого соотношения 1:3 в пользу преобладания фертильной пыльцы наблюдались в пыльниках мужских цветков у всех изученных растений (данные не представлены). Следует отметить, что у отцовских растений-опылителей также присутствовали ПЗ с вышеописанными типами нарушений, однако доля фертильной пыльцы у них была значительно выше, по сравнению с гибридами.

Таким образом, представленные данные цитологического анализа свидетельствуют о вероятности образования у гибридов F_1 , гетерозиготных по генам-восстановителям $Rf3$ и $Rf4$, пыльцевых зерен, несущих рецессивные аллели генов-восстановителей. Возможно, у созданных нами ЦМС-линий гены-восстановители $Rf3$ и $Rf4$ начинают функционировать уже в тканях спорофита, нормализуя развитие некоторой доли ПЗ, несущих рецессивные аллели этих генов ($rf3$ и $rf4$), которые участвуют в оплодотворении и дают начало стерильным генотипам, выявляемым в F_2 или в BC_1 . Однако такое раннее функционирование этих генов способствует развитию только части ПЗ, значительное число пыльцевых зерен, без генов-восстанови-

Таблица 7. Влияние отбора в семьях гибридов F₂ ♀ А₃ Топаз × ♂ КВВ-96 в контрастных по дефициту влажности воздуха условиях в период цветения на проявление мужской фертильности в самоопыленном потомстве (F₃)

Семья	Число растений с уровнем фертильности, шт.			Уровень фертильности, %	Дефицит влажности воздуха в период цветения, гПа
	100–71%	70–51 %	< 50 %		
Семьи F ₃ от растений F ₂ , которые цвели при дефиците влажности воздуха 13.8 гПа					
8/2	4	5	6	57.7	16.4
9/2	7	3	5	63.0	16.4
10/1	5	3	7	60.7	16.2
10/2	6	3	6	62.7	16.5
Всего	22	14	24	61.0 а	16.4
Семьи F ₃ от растений F ₂ , которые цвели при дефиците влажности воздуха 23.0 гПа					
11/1	9	5	0	76.0	16.9
11/2	10	4	0	81.0	16.6
13/1	11	4	0	83.7	16.7
13/2	10	4	0	81.9	16.3
Всего	40	17	0	80.7 b	16.6
F				300.3**	
НCP ₀₅				3.6	

Примечание. Данные, отмеченные разными буквами, различаются при $p < 0.05$ в соответствии с тестом множественных сравнений Дункана; ** $p < 0.01$.

телей, все же дегенерирует, как показывают результаты цитологического анализа пыльцы. На справедливость этой гипотезы указывает наличие большого числа «промежуточных» фенотипов ПЗ, с признаками частичной дегенерации (см. рисунок), что не было описано ранее в литературе.

Отбор на устойчивость к дефициту влажности воздуха. Вода и ее перемещение внутри пыльника, а также давление водяного пара в окружающей среде играют важную роль в функционировании механизмов, обеспечивающих раскрытие пыльника и распыление пыльцы (Wilson et al., 2011). Как известно, показателем, характеризующим давление водяного пара в окружающей среде, служит дефицит влажности воздуха – разность между максимально возможной и фактической упругостью водяного пара при данных температуре и давлении.

Учитывая, что дефицит влажности воздуха в фазу цветения подавляет функционирование генов-восстановителей ЦМС А₃ сорго (Kozhemyakin et al., 2017), мы поставили эксперимент по изучению возможности отбора на устойчивость к этому фактору (табл. 7). В гибридной популяции F₂ ♀ А₃ Топаз × ♂ КВВ-96 в 2016 г. были отобраны две группы полностью фертильных растений, цветение которых протекало при дефиците влажности воздуха 13.8 и 23.0 гПа. В 2017 г. при цветении в условиях 16.4–16.6 гПа в поколении F₃ уровень фертильности в этих группах отборов значимо различался: 61.0 и 80.7 % соответственно ($p < 0.01$) (см. табл. 7). Детальный анализ показал, что выявленные различия оказались обусловлены присутствием в первой группе растений с невысоким уровнем мужской фертильности (< 50 %), тогда как во второй группе такие растения полностью отсутствовали. Эти данные свидетельствуют о наличии генетического

фактора, обуславливающего устойчивость к дефициту влажности воздуха, действующего на стадии цветения и влияющего на экспрессию генов-восстановителей мужской фертильности ЦМС А₃. По-видимому, в условиях высокого дефицита влажности воздуха (23.0 гПа) восстановление фертильности было возможно только при гомозиготности по этому гену, в результате чего в потомстве этих растений расщепление отсутствовало, тогда как при отборе в условиях низкого дефицита влажности (13.8 гПа) фертильными могли быть гетерозиготы, расщепление которых мы наблюдали в F₃ (см. табл. 7). Полученные результаты указывают на эффективность отбора на устойчивость системы восстановления фертильности А₃-типа ЦМС к дефициту влажности воздуха.

Обсуждение

В соответствии с современными представлениями о закономерностях генетического контроля ЦМС, стерилизация мужской генеративной сферы происходит в результате функционирования митохондриальных ЦМС-индуцирующих генов, тогда как ядерные гены-восстановители фертильности, в большинстве случаев, блокируют их экспрессию на транскрипционном или посттранскрипционном уровне (Chase, Gabay-Laughnan, 2004; Horn et al., 2014; Bohra et al., 2016). При этом если функционирование гена-восстановителя начинается в тканях спорофита (пыльника), то восстановление фертильности носит спорофитный характер, при котором в пыльнике развиваются фертильные ПЗ, несущие доминантный ген-восстановитель фертильности, и ПЗ, несущие его рецессивный аллель, не обладающий способностью к восстановлению фертильности. Если же функционирование гена-восстановителя начинается на стадии гаметогенеза,

то фертильными оказываются только ПЗ, несущие генов-восстановитель, тогда как ПЗ, не содержащие гена-восстановителя, дегенерируют и не участвуют в оплодотворении (гаметофитный тип восстановления фертильности) (Kaul, 1988).

Полученные нами экспериментальные данные показывают некоторую условность такого подразделения. Появление стерильных растений в семьях F₂ и BC₁ с материнской ЦМС-линией, выращенных при разных режимах влагообеспеченности – на делянке с дополнительным поливом, в климатической камере при 70 % относительной влажности воздуха, на делянке с засушливым фоном, на опытном поле при естественных условиях влагообеспеченности, – свидетельствует в пользу спорофитного контроля восстановления фертильности в изученных гибридных комбинациях двумя генами-восстановителями. Учитывая, что источником генов-восстановителей служила линия IS112C, несущая гены-восстановители фертильности *Rf3* и *Rf4*, которые, по литературным данным (Tang et al., 1998; Pring et al., 1999), являются гаметофитными восстановителями фертильности, данный факт представляется исключительно интересным и необычным, поскольку считается, что гаметофитный и спорофитный типы восстановления фертильности контролируются разными генетическими системами (Kaul, 1988).

Вместе с тем результаты цитологического анализа пыльцы фертильных гибридов F₁, выявившего значительное количество дегенерирующих пыльцевых зерен, свидетельствуют о гаметофитном типе восстановления фертильности. По-видимому, в генотипах созданных нами ЦМС-линий гены-восстановители фертильности *Rf3* и *Rf4* функционируют иначе, нежели в генотипах ЦМС-линий, созданных в США на Техасской опытной станции. В работе индийских исследователей был также показан спорофитный тип наследования восстановления фертильности в ЦМС A₃, контролируемый тремя комплементарными генами-восстановителями (Reddy et al., 2010).

Возможно, в созданных нами ЦМС-линиях функционирование генов-восстановителей *Rf3* и *Rf4* начинается уже в тканях спорофита, нормализуя развитие некоторой части ПЗ, несущих рецессивные аллели этих генов (*rf3* и *rf4*), которые участвуют в оплодотворении и дают начало стерильным генотипам, выявляемым в семьях F₂ и BC₁. Примечательно, аналогичная гипотеза была высказана для объяснения появления стерильных растений в потомстве некоторых гибридов кукурузы с S-типом ЦМС, имеющим гаметофитный механизм восстановления фертильности (Duvick, 1965).

Следует отметить, что нами впервые обнаружено трансгенерационное влияние условий влагообеспеченности растений линии-восстановителя на характер расщепления по мужской фертильности в поколении F₂: опылитель, выращенный в условиях делянки с дополнительным поливом, формировал значительно больше фертильных и меньше стерильных индивидуумов по сравнению с опылителем, выращенным в условиях засушливого фона. При этом характер расщепления изменялся с дигенного на моногенный, свидетельствуя о наследуемом ингибировании экспрессии одного из генов-восстановителей в усло-

виях засухи (своеобразный «эффект дедушки»). Известно, что подобные трансгенерационные эффекты обусловлены разнообразными изменениями на эпигенетическом уровне (Hauser et al., 2011; Paszkowski, Grossniklaus, 2011; Kumar et al., 2015; Tricker, 2015; Alsdurf et al., 2016). В их основе лежат изменения характера метилирования ДНК, которые возникают, в том числе, в результате воздействия факторов внешней среды, в частности стресса засухи (Lukens, Zhan, 2007; Wang et al., 2011; Tricker et al., 2012; Zheng et al., 2013).

Возможно, именно изменения характера метилирования обуславливают утрату функциональной активности одного из генов-восстановителей ЦМС A₃ в условиях засухи. С помощью MSAP-анализа гибридов F₁ A₃ КП-70/КВВ-96 нам удалось выявить фрагменты ДНК, характер метилирования которых в контрастных по влагообеспеченности условиях коррелирует с проявлением мужской фертильности (Elkonin et al., 2019). Очевидно, изменение характера метилирования является важным механизмом, регулирующим восстановление фертильности в цитоплазме A₃ сорго.

Заслуживает также внимания показанная нами возможность отбора на устойчивость системы восстановления фертильности в цитоплазме A₃ к функционированию в условиях дефицита влажности воздуха в период цветения (см. табл. 7). Такой отбор может способствовать созданию новых восстановителей фертильности этого типа ЦМС и его использованию в селекции гибридного сорго.

Список литературы / References

- Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984.
[Zaitsev G.N. Mathematical Statistics in Experimental Botany. Moscow: Nauka Publ., 1984. (in Russian)]
- Alsdurf J., Anderson C., Siemens D.H. Epigenetics of drought-induced trans-generational plasticity: consequences for range limit development. *AoB Plants*. 2016;8: plv146. DOI 10.1093/aobpla/plv146.
- Atkin O.K., Macherel D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann. Bot.* 2009;103:581-597. DOI 10.1093/aob/mcn094.
- Bohra A., Jha U.C., Adhimoolam P., Bisht D., Singh N.P. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Rep.* 2016;35:967-993. DOI 10.1007/s00299-016-1949-3.
- Chase C.D., Gabay-Laughnan S. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration by nuclear genes. Eds. H. Daniell, C.D. Chase. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. New York: Springer, 2004;593-621.
- Dahlberg J.A., Madera-Torres P. Restorer reaction in A1 (AT×623), A2 (A2T×632), and A3 (A3SC 103) cytoplasms to selected accessions from the Sudan sorghum collection. *Int. Sorghum Millet Newsl.* 1997;38:43-58.
- Dolferus R., Powell N., Xuemei J.I., Ravash R., Edlington J., Oliver S., Van Dongen J., Shiran B. The physiology of reproductive-stage abiotic stress tolerance in cereals. Eds. G.R. Rout, A.B. Das. *Molecular Stress Physiology of Plants*. Dordrecht; Heidelberg; New York; London: Springer Science & Business Media, 2013;193-216. DOI 10.1007/978-81-322-0807-5_8.
- Duvick D.N. Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Adv. Genet.* 1965; 13:1-56. DOI 10.1016/S0065-2660(08)60046-2.
- Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A., Tsvetova M.I., Sarsenova S.Kh., Rozhnova N.A. Environmental effects on expression of A₃ type CMS of sorghum. *Intern. J. Plant Reprod. Biol.* 2019;11(2). Accepted for publication.

- Hauser M.T., Aufsatz W., Jonak C., Luschnig C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1809(8): 459-468. DOI 10.1016/j.bbagra.2011.03.007.
- Horn R., Gupta K.J., Colombo N. Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Mitochondrion.* 2014;19:198-205. DOI 10.1016/j.mito.2014.04.004.
- Jacoby R.P., Li L., Huang S., Lee C.P., Millar A.H., Taylor N.L. Mitochondrial composition, function and stress response in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 2012;54:887-906. DOI 10.1111/j.1744-7909.2012.01177.x.
- Kaul M.L.H. Male Sterility in Higher Plants (Monographs on Theoretical and Applied Genetics, Vol. 10). London: Springer-Verlag, 1988.
- Kozhemyakin V.V., Elkonin L.A., Dahlberg J.A. Effect of drought stress on male fertility restoration in A₃ CMS-inducing cytoplasm of sorghum. *Crop J.* 2017;5(4):282-289. DOI 10.1016/j.cj.2017.02.003.
- Kuhlman L.C., Pring D.R., Rooney W.L., Tang H.V. Allelic frequency at the *Rf3* and *Rf4* loci and the genetics of A₃ cytoplasmic fertility restoration in converted Sorghum lines. *Crop Sci.* 2006;46:1576-1580. DOI 10.2135/cropsci2005.10-0380.
- Kumar S., Kumari R., Sharma V. Transgenerational inheritance in plants of acquired defense against biotic and abiotic stresses: implications and applications. *Agric. Res.* 2015;4(2):109-120. DOI 10.1007/s40003-015-0170-x.
- Li S., Wan C., Hu C., Gao F., Huang Q., Wang K., Wang T., Zhu Y. Mitochondrial mutation impairs cytoplasmic male sterility rice in response to H₂O₂ stress. *Plant Sci.* 2012;195:143-150. DOI 10.1016/j.plantsci.2012.05.014.
- Liberatore K.L., Dukowicz-Schulze S., Miller M.E., Chen C., Kianian S.F. The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. *Free Rad. Biol. Med.* 2016;100:238-256. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.033.
- Lukens L.N., Zhan S.H. The plant genome's methylation status and response to stress, implications for plant improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007;10:317-322. DOI 10.1016/j.pbi.2007.04.012.
- McDonald J.H. Handbook of Biological Statistics (3rd ed.). Baltimore, Maryland: Sparky House Publ., 2014. (<http://udel.edu/~mcdonald/statexactbin.html>).
- Ng S., De Clercq I., Van Aken O., Law S.R., Ivanova A., Willems P., Giraud E., Van Breusegem F., Whelan J. Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Mol. Plant.* 2014;7:1075-1093. DOI 10.1093/mp/ssu037.
- Paszkowski J., Grossniklaus U. Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011;14:195-203. DOI 10.1016/j.pbi.2011.01.002.
- Pring D.R., Tang H.V., Howad W., Kempken F. A unique two-gene gametophytic male sterility system in sorghum involving a possible role of RNA editing in fertility restoration. *J. Hered.* 1999;90: 386-393.
- Reddy B.V.S., Ramesh S., Ortiz R. Genetic and cytoplasmic-nuclear male sterility in Sorghum. Ed. J. Janik. *Plant Breeding Reviews.* Hoboken; New Jersey: Wiley & Sons, Inc., 2005;Vol. 25: 139-169.
- Reddy S.P., Rao M.D., Reddy B.V.S., Kumar A.A. Inheritance of male-fertility restoration in A₁, A₂, A₃ and A_{4(M)} cytoplasmic male-sterility systems of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Indian J. Genet.* 2010;70(3):240-246.
- Tang H.V., Chang R., Pring D.R. Co-segregation of single genes associated with fertility restoration and transcript processing of sorghum mitochondrial *orf107* and *urf209*. *Genetics.* 1998;150:383-391.
- Tang H.V., Pedersen J.F., Chase C.D., Pring D.R. Fertility restoration of the sorghum A₃ male-sterile cytoplasm through a sporophytic mechanism derived from sudangrass. *Crop Sci.* 2007;47:943-950. DOI 10.2135/cropsci2006.08.0542.
- Torres-Cardona S., Sotomayor-Rios A., Quiles Belen A., Schertz K.F. Fertility restoration to A₁, A₂, and A₃ cytoplasm systems of converted sorghum lines. MP-1721. Texas Agric. Exp. Stn., Texas A&M Univ., College Station, 1990;1-11.
- Tricker P.J. Transgenerational inheritance or resetting of stress-induced epigenetic modifications: two sides of the same coin. *Front. Plant Sci.* 2015;6:699. DOI 10.3389/fpls.2015.00699.
- Tricker P.J., Gibbins J.G., Lopez C.M.R., Hadley P., Wilkinson M.J. Low relative humidity triggers RNA-directed *de novo* DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J. Exp. Bot.* 2012;63(10):3799-3814. DOI 10.1093/jxb/ers076.
- Wang W.-S., Pan Y.J., Zhao X.-Q., Dwivedi D., Zhu L.-H., Ali J., Fu B.-Y., Li Z.-K. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 2011;62:1951-1960. DOI 10.1093/jxb/erq391.
- Wilson Z.A., Song J., Taylor B., Yang C. The final split: the regulation of anther dehiscence. *J. Exp. Bot.* 2011;62:1633-1649. DOI 10.1093/jxb/err014.
- Worstell J.V., Kidd H.J., Schertz K.F. Relationships among male-sterility inducing cytoplasm of sorghum. *Crop Sci.* 1984;24(1): 186-189.
- Zheng X., Chen L., Li M., Lou Q., Xia H., Wang P., Li T., Liu H., Luo L. Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. *PLoS One.* 2013;8(11):e80253. DOI 10.1371/journal.pone.0080253.

ORCID ID

L.A. Elkonin orcid.org/0000-0003-3806-5697
V.V. Kozhemyakin orcid.org/0000-0002-8758-5819
M.I. Tsvetova orcid.org/0000-0002-5239-5097

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-01131). Авторы благодарны к.б.н. О.П. Кибальник (РосНИИСК «Россорго», Саратов, Россия) за предоставление семян линий зернового сорго КП-70 и Топаз, д-ру К.Ф. Шертцу (K.F. Schertz, Texas Agricultural Experimental Station, США) за семена линии АЗТх398, д-ру Х.Д. Упадхия (H.D. Upadhyaya, ICRISAT, Patancheru, Индия) за семена линии IS1112C. Авторы выражают благодарность рецензенту за критический анализ текста статьи и ценные замечания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.12.2018. После доработки 03.03.2019. Принята к публикации 06.03.2019.

Модифицированный метод капель-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля

Т.А. Гавриленко^{1, 2}✉, Н.А. Швачко¹, Н.Н. Волкова¹, Ю.В. Ухатова¹

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Коллекции возделываемого картофеля *Solanum tuberosum*, сохраняемые в полевых генбанках, несут значительные потери из-за воздействия экстремальных факторов внешней среды, заболеваний и вредителей. Практическое решение проблемы надежного хранения генофонда возделываемого картофеля состоит в создании дублетных криоколлекций, сохраняемых при сверхнизких температурах в криобанках. Известно несколько методов криоконсервации картофеля, из них в настоящее время в мировых генбанках наиболее широко используется метод капель-витрификации, разработанный Б. Панисом с коллегами в 2005 г. В нашей статье представлено подробное описание модифицированного метода капель-витрификации, который применяется для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Модифицированный в ВИР метод включает основные этапы оригинального метода капель-витрификации, разработанного Б. Панисом с коллегами: 1) подготовка растительного материала; 2) изоляция апексов микрорастений; 3) обработка эксплантов растворами с криопротекторами; 4) криоконсервация/погружение в жидкий азот; 5) оттаивание; 6) посткриогенное восстановление и учет регенерационной способности. Предложенные нами модификации этапов 1, 2 и 6 позволяют существенно сократить продолжительность экспериментов по криоконсервации в сравнении с оригинальным методом. В работе представлены результаты экспериментов по криоконсервации аборигенных южноамериканских сортов и современных селекционных сортов картофеля, которые были выполнены с использованием модифицированного в ВИР метода капель-витрификации. Большая часть (76.7 %) изученных образцов культурного картофеля характеризовалась высокими показателями посткриогенной регенерации (40–95 %), и у 23.3 % изученных образцов частота регенерации после замораживания–оттаивания варьировала от 20 до 39 %, что соответствует предельно допустимым минимальным значениям для закладки на длительное хранение в криобанк. В настоящее время модифицированный метод капель-витрификации используется для расширения криоколлекции культурных видов картофеля в ВИР.

Ключевые слова: картофель; криоконсервация; капель-витрификация; криобанк.

Для цитирования: Гавриленко Т.А., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Ухатова Ю.В. Модифицированный метод капель-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):422-429. DOI 10.18699/VJ19.505

A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from *in vitro* potato plants

T.A. Gavrilenko^{1, 2}✉, N.A. Shvachko¹, N.N. Volkova¹, Yu.V. Ukhatova¹

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

² Saint Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Collections of common potato maintained in the field genebanks suffer significant losses due to the impact of extreme environmental factors, diseases and pests. The solution of the problem of safe long-term preservation of common potato accessions is to create doublet *in vitro* and *cryo*-collections. Cryogenic collections are stored at ultra-low temperatures in cryobanks. Several methods of potato cryoconservation are known, of which the droplet vitrification method developed by B. Panis with colleagues in 2005 is the most widely used in genebanks. This paper provides a detailed description of the modified method of droplet vitrification, which is used for cryopreservation of apices (shoot tips) of potato *in vitro* plants at the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR). The method modified at VIR includes the main steps of the original droplet-vitrification method developed by B. Panis and colleagues: 1) preparation of plant material, 2) isolation of shoot tips, 3) treatment of explants with cryoprotector solutions, 4) freezing/immersion in liquid nitrogen, 5) thawing, 6) post-cryogenic recovery and evaluation of viability and regeneration capacity. The modifications of stages 1, 2 and 6 proposed at VIR lead to a significant reduction in the duration of cryopreservation experiments in comparison with the original method of B. Panis. This paper presents the results of cryopreservation of modern potato cultivars and South American landraces which were obtained using the method of droplet vitrification as modified at VIR. The majority (76.7 %) of

the studied accessions of cultivated potato were characterized by high rates of postcryogenic recovery (40–95 %) and 23.3 % of the samples had the values of postcryogenic regeneration from 20 to 39 %, which corresponds to the minimal permissible values for long-term storage in a cryobank. Currently the modified droplet-vitrification method is used for further expanding of the VIR potato cryocollection.

Key words: potato; cryopreservation; droplet-vitrification; cryobank.

For citation: Gavrilenko T.A., Shvachko N.A., Volkova N.N., Ukhato Yu.V. A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from *in vitro* potato plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):422-429. DOI 10.18699/VJ19.505 (in Russian)

Введение

Коллекции возделываемого картофеля *Solanum tuberosum*, сохраняемые в полевых генбанках, несут значительные потери из-за воздействия экстремальных факторов внешней среды, заболеваний и вредителей. Практическое решение проблемы надежного хранения генофонда возделываемого картофеля состоит в формировании дублетных *in vitro* коллекций и создании на их основе криоколлекций, которые долгосрочно сохраняют в криобанках при сверхнизких температурах (Keller et al., 2006; Гавриленко и др., 2007; Engelman, 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015; Panis et al., 2016; Vollmer et al., 2016).

В настоящее время разработаны международные стандарты генбанков для длительного хранения семян в условиях низких температур (FAO, 2014), согласно которым сохраняется и коллекция образцов семян в ВИР (Филиппенко, 2007). Что касается стандартов хранения криоколлекций образцов вегетативно размножаемых культур, в частности картофеля, то до последнего времени они находятся на стадии активного обсуждения (Kaczmarczyk et al., 2011; Niino, Valle Arizaga, 2015; Vollmer et al., 2016, 2017; Ухатова, Гавриленко, 2018). Данная ситуация связана с тем, что ни один из способов криоконсервации не является унифицированным для определенного растительного объекта. Например, в мировой практике для криоконсервации апексов *in vitro* растений возделываемого картофеля *S. tuberosum* используют методы быстрого замораживания: капель-замораживания (Kaczmarczyk et al., 2011), витрификации (Kushnarenko et al., 2017), капель-витрификации (Kim et al., 2006; Bamberg et al., 2016; Vollmer et al., 2017). Перечисленные методы различаются техникой исполнения отдельных этапов и составом растворов с криопротекторами (Ухатова, Гавриленко, 2018). Так, при использовании метода витрификации экспланты обрабатывают раствором с криопротектором (чаще всего – PVS2) непосредственно в криопробирке, а в варианте метода капель-замораживания экспланты погружают в капли жидкой среды MS с криопротектором (10 % раствор DMSO), нанесенные на полоски фольги. Метод капель-витрификации сочетает особенности двух предыдущих методов: экспланты помещают в капли с раствором криопротектора (чаще всего – PVS2), нанесенные на полоски фольги.

В настоящее время для криоконсервации картофеля широко используется метод капель-витрификации, как наиболее воспроизводимый и простой в исполнении. Изначально метод был разработан Б. Панисом с коллегами для криоконсервации образцов банана (Panis et al., 2005). В дальнейшем оригинальный протокол Б. Паниса был многократно модифицирован для различных рас-

тительных объектов, в том числе картофеля (Kim et al., 2006; Bamberg et al., 2016; Vollmer et al., 2017) (Приложение 1)¹. В ВИР криоконсервация апексов микрорастений картофеля с использованием метода капель-витрификации была начата в 2010 г., при этом протокол Б. Паниса также был существенно модифицирован (Дунаева и др., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Ухатова и др., 2017). В Приложении 1 приведены четыре модификации оригинального метода капель-витрификации Б. Паниса (Panis et al., 2005), которые сегодня используют для криоконсервации образцов картофеля в ведущих мировых генбанках: CIP (Перу); USPG (США); NAC, NAAS, RDA (Южная Корея); ВИР (РФ) (протокол IPK, Германия не приводится, поскольку в этом генбанке до сих пор используется капель-метод). Все модификации включают шесть общих этапов: 1) подготовка растительного материала; 2) изоляция апексов микрорастений; 3) обработка эксплантов раствором PVS2 с криопротекторами; 4) криоконсервация/погружение в жидкий азот полосок фольги с каплями раствора PVS2, в которых находятся экспланты; 5) оттаивание; 6) посткриогенное восстановление и учет регенерационной способности (см. Прил. 1 и рисунок). Сравнение оригинального и четырех модифицированных методов капель-витрификации позволяет заключить, что фактически каждая модификация отличается по продолжительности отдельных этапов, составу культуральных сред и условиям культивирования. По сравнению с оригинальным методом Б. Паниса предложенные в ВИР модификации этапов 1, 2 и 6 позволили существенно сократить продолжительность всего цикла криоконсервации (см. Прил. 1).

В данной статье приведено подробное описание модифицированного в ВИР метода капель-витрификации, а также представлены результаты его использования для криоконсервации апексов *in vitro* растений 43 образцов трех культурных видов картофеля.

Материал исследования

В качестве материала исследования использованы 44 образца из *in vitro* коллекции ВИР, включая 43 образца культурного картофеля и один образец дикого вида *S. spegazzinii* (см. таблицу). Образцы культурного картофеля были представлены: 5 образцами тетраплоидных андийских аборигенных сортов – *S. tuberosum* ssp. *andigenum*; 7 образцами чилийских аборигенных сортов – *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*; 20 образцами андийских диплоидных культурных видов – *S. phureja* (8 образцов) и *S. stenotomum* (12 образцов); 10 селекционными сортами возделываемо-

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx7.pdf>

го картофеля *S. tuberosum* и одним селекционным клоном NZ-32. Все образцы ранее были детально охарактеризованы по числу хромосом, генотипированы с использованием SSR-маркеров и маркеров разных типов цитоплазм (Gavrilenko et al., 2010; Antonova et al., 2017).

Методы

Питательные среды и растворы для криоконсервации

Безгормональная среда Мурасиге и Скуга (MS) твердая: макроэлементы, микроэлементы, витамины (Murashige, Skoog, 1962), сахара 30 г/л, агар 7 г/л, pH 5.8. После приготовления среду автоклавируют.

Безгормональная среда MS жидкая: макросоли, микросоли, витамины (Murashige, Skoog, 1962), сахара 30 г/л, pH 5.8. Среду необходимо проавтоклавируют.

Раствор LS (Loading solution): осмо- и криопротектор на основе MS с добавлением сахара 136.8 г/л, глицерола 184 г/л, pH 5.8. Приготовленную среду не автоклавируют и хранят в морозильнике при -20°C . Перед применением необходимое количество среды стерилизуют через стерильный мембранный фильтр (диаметр пор 0.45 мкм) (Panis et al., 2005).

Раствор PVS2 (Plant Vitrification Solution – витрифицирующий раствор): макросоли, микросоли, витамины и глицин по MS (Murashige, Skoog, 1962), сахара 136.8 г/л (0.4 M), глицерол 300 г/л, этиленгликоль 150 г/л, DMSO 150 г/л, pH 5.8. Среда не подлежит автоклавированию и стерилизуется с помощью стерильных мембранных фильтров с размером пор 0.45 мкм (Sakai et al., 1990). Хранится в морозильнике при -20°C .

Раствор RS (среда для размораживания): жидкая среда MS с добавлением 410.4 г/л сахара, pH в пределах 5.6–5.8. Среду можно автоклавируют.

Среда MSto для посткриогенной регенерации: макросоли, микросоли, витамины по MS, сахара 20 г/л, агар 7 г/л, зеатин рибозид 0.5 мг/л, ИУК 0.5 мг/л, ГК 0.2 мг/л (фитогормоны добавляют после автоклавирования), pH 5.8 (Towill, 1983). Для стерилизации безгормональную среду MS автоклавируют. Раствор фитогормонов стерилизуют через стерильный мембранный фильтр (размер пор 0.22 мкм) и добавляют в охлажденную до 50°C среду MS.

Модифицированный в ВИР метод дроппет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля

Первый этап – подготовка микрорастений. Основная задача первого этапа – микроразмножение и получение достаточного количества апексов для проведения трех повторностей эксперимента. С этой целью используют одноузловые микрочеренки *in vitro* растений картофеля, которые высаживают по 15–20 штук в стеклянные сосуды объемом 0.5 л, заполненные 45–50 мл питательной агаризованной среды MS без гормонов с 30 г/л сахара на 3–4 недели (см. рисунок, а). Культивирование проводят на светоустановке с освещенностью 3–4 клк при $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ с 16-часовым фотопериодом.

Второй этап – изоляция эксплантов. Направлен на получение достаточного числа эксплантов для криоконсер-

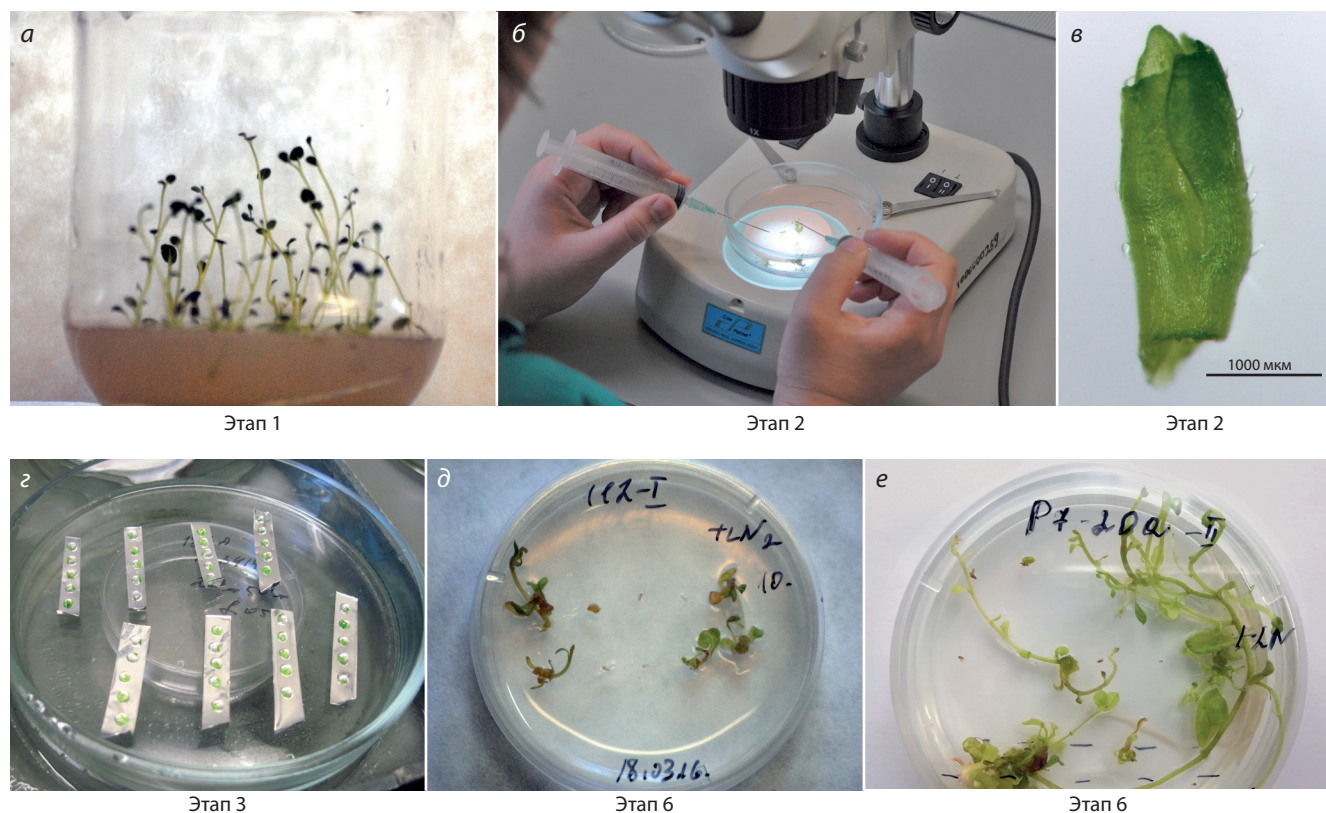
вации. В качестве эксплантов используют апексы побегов микрорастений. Для изоляции апексов выбирают хорошо развитые микрорастения картофеля. Все работы на данном этапе проводят со стереомикроскопом и со стерильными медицинскими иглами, надетыми на два одноразовых шприца – по одному для каждой руки. Лево́й рукой оператор прижимает часть микропобега (микрочеренок), а право́й рукой отсекает листья и стебель, оставляя апекс неповрежденным (см. рисунок, б, в). Верхушечные почки микрорастений размером 1.8–2.5 мм помещают в жидкую среду MS на время изоляции остальных эксплантов.

Отдельно остановимся на числе эксплантов, необходимом для надежного криохранения образца. Для каждого образца криоконсервация выполняется в трех независимых повторностях. В каждой повторности опыта изолируют 60 эксплантов: 10 из них используют в качестве контроля для проверки влияния питательных сред, осмо- и криопротекторов на жизнеспособность эксплантов (без обработки жидким азотом); 20 – погружают в жидкий азот на 1 ч для учета регенерационной способности после оттаивания; 30 эксплантов (без оттаивания) передают на длительное криохранение в биокриокомплекс ВИР. Согласно литературным данным, одного часа экспозиции эксплантов в жидком азоте достаточно для адекватной оценки эффективности посткриогенной регенерации (Panis et al., 2005; Kim et al., 2006; Yoon et al., 2006; Kaczmarczyk et al., 2011; Bamberg et al., 2016).

Третий этап – обработка эксплантов криопротектором, проводят для осмо- и криопротекции эксплантов. На этом этапе применяют двухступенчатую инкубацию изолированных эксплантов: сразу после изоляции апексы в чашке Петри помещают на 20 мин при комнатной температуре в раствор LS, после чего их переносят на 30 мин на лед в заранее охлажденный раствор PVS2. Растворы LS и PVS2 содержат смесь осмо- и криопротекторов (LS – сахара и глицерола, PVS2 – сахара, глицерола, этиленгликоля и DMSO).

Четвертый этап – замораживание эксплантов в жидком азоте, заключается в непосредственном воздействии жидкого азота на апексы побегов. Перед погружением в жидкий азот подготавливают полоски алюминиевой фольги размером 25×5 мм. Стерильным наконечником наносят по 5 капель среды PVS2 на каждую полоску. Переносят по одному апексу в каждую каплю (см. рисунок, г). Затем полоски фольги с эксплантами погружают в криопробирку, заполненную жидким азотом (по 2 полоски на пробирку), плотно их закрывают и опускают в переносной сосуд Дьюара с жидким азотом. Криопробирки перед началом эксперимента маркируют, обозначив название сорта, номер в каталоге ВИР и год закладки на длительное криохранение. Сосуд Дьюара с маркированными криопробирками, содержащими апексы побегов, передают в биокриокомплекс на длительное криохранение. Для оценки частоты посткриогенной регенерации образцов достаточно погрузить криопробирку в жидкий азот на один час. Одного часа экспозиции в жидком азоте достаточно для адекватной оценки эффективности регенерации (Panis et al., 2005; Kaczmarczyk et al., 2011).

Пятый этап – оттаивание. Этот этап необходим для оценки частоты посткриогенной регенерации образцов.



Этапы криоконсервации образцов картофеля с использованием модифицированного в ВИР метода капель-витрификации.

а – микроразмножение *in vitro* растений (этап 1); б – изоляция апексов *in vitro* растений; в – изолированный эксплант (этап 2); г – инкубация эксплантов в каплях раствора криопротектора PVS2 непосредственно перед погружением в жидкий азот (этап 3); д – посткриогенная регенерация образца *S. stenotomum*, k-11053 (112) на 6-й неделе культивирования после замораживания–оттаивания; е – посткриогенная регенерация образца *S. phureja* k-99 (P7-20a) на 8-й неделе после замораживания–оттаивания (этап 6).

Полоски фольги с эксплантами извлекают пинцетом из жидкого азота и быстро погружают их в раствор RS на 15 мин. Затем экспланты переносят в чашки Петри со средой MSTo.

Шестой этап – изучение способности образцов к посткриогенному восстановлению (оценка частоты посткриогенной регенерации). Чашки Петри с эксплантами на среде MSTo помещают на светоустановку с освещенностью 3–4 клк, температурой 20–25 °C и 16-часовым фотопериодом. Эффективность восстановления после криоконсервации для каждого образца оценивают на 8-й неделе беспересадочного культивирования по показателям: 1) жизнеспособности эксплантов (число, % зеленых почек на питательной среде MSTo; параллельно учитывают и процентное содержание некротизировавшихся эксплантов) и 2) регенерационной способности (число, % эксплантов, сформировавших микропобеги) (см. рисунок, е). Эти показатели вносят в таблицу рекомендуемого образца (Прил. 2), вычисляя средние значения по трем независимым повторностям опыта с подсчетом ошибки среднего. Статистическую обработку данных проводят с использованием методов описательной статистики. Влияние фактора «генотип» оценивали методом однофакторного анализа.

Минимальные значения частоты посткриогенной регенерации образца, передаваемого на длительное хранение

в криобанк, четко не регламентированы; этот вопрос, с подробным анализом подходов к расчетам значений данного показателя в зависимости от числа сохраняемых эксплантов, подробно обсуждается в обзоре (Ухатова, Гавриленко, 2018). Ранее международные организации, занимающиеся вопросами сохранения биоразнообразия, рекомендовали включать в криоколлекции образцы, частота посткриогенной регенерации которых составляет не менее 20 % (IPGRI, 2000). В настоящее время в отдельных генбанках принят более жесткий регламент: для закладки образца в криобанк рекомендуется минимально допустимая частота посткриогенной регенерации эксплантов не ниже 39 % (Panis et al., 2016).

В ВИР криоколлекция картофеля формируется согласно следующим требованиям: для определения частоты посткриогенной регенерации каждого образца необходимо проведение трех независимых повторностей криоконсервации. В соответствии с полученными результатами посткриогенного восстановления образцы дифференцируются на три группы: А) образцы с высокой частотой посткриогенной регенерации – выше 40 %; Б) образцы со средними показателями частоты регенерации – от 21 до 39 %; В) образцы с низкой регенерационной способностью – ниже 20 %. Образцы из первых двух групп (А и Б) считаются надежно сохраняемыми в криобанке, образцы из группы В требуют индивидуального подхода –

либо увеличения числа повторностей, либо дальнейшей модификации метода дроплет-витрификации (Ухатова, Гавриленко, 2018).

Пошаговый протокол

1. Одноузловые микрочеренки *in vitro* растений картофеля высадить по 15–20 штук в стеклянные сосуды объемом 0.5 л, заполненные 45–50 мл питательной агаризованной среды MS без гормонов с 30 г/л сахарозы, и культивировать в течение 3–4 недель при 22 ± 2 °C, фотопериоде 16/8 (см. рисунок, а).
2. В ламинаре с использованием стереомикроскопа для каждой повторности изолировать стерильными иглами, закрепленными на шприцах, 60 апексов микро-растений картофеля размером 1.8–2.5 мм (см. рисунок, б, в).
3. Изолированные апексы поместить в стерильную одноразовую пластиковую чашку Петри (диаметром 6 см) с 5 мл жидкой среды MS до окончания изоляции всех остальных эксплантов.
4. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл удалить жидкую среду MS из чашки Петри. Следить за тем, чтобы апексы не попали внутрь наконечника. Наконечник сменить.
5. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл добавить в чашку Петри 5–10 мл раствора LS так, чтобы все апексы были им полностью покрыты. Оставить в ламинаре на 20 мин при комнатной температуре.
6. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл удалить раствор LS из чашки Петри. Следить за тем, чтобы апексы не попали внутрь наконечника. Наконечник сменить.
7. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл внести в чашку Петри 5–10 мл заранее охлажденного раствора PVS2 так, чтобы все апексы были им полностью покрыты. Оставить чашку Петри с апексами в ламинаре на 30 мин на хладоэлементе.
8. Спустя 20 мин инкубации апексов в растворе PVS2 начать подготовку полосок алюминиевой фольги: в стеклянную чашку Петри диаметром 10 см пинцетом поместить 10 полосок стерильной фольги.
9. Дозатором со стерильным наконечником объемом 10 мкл или диспенсером нанести на каждую полосу по 5 капель раствора PVS2 объемом 2.5 мкл каждая.
10. Глазным пинцетом переместить по одному апексу из пластиковой чашки Петри в каждую каплю на полоске фольги. Десять апексов оставить в исходной чашке Петри (см. рисунок, г).
11. Провести маркировку пяти криопробирок, указав название и номер каталога образца, а также год проведения криоконсервации.
12. Поставить в ламинар пенопластовый штатив для криопробирок.
13. Налить в штатив жидкий азот.
14. Открытые маркированные криопробирки по одной ставить в штатив, заполненный жидким азотом; крышки складывать в пустую стеклянную чашку Петри.
15. Все криопробирки полностью залить жидким азотом.
16. После 30-минутной инкубации в растворе PVS2 полоски фольги с апексами быстро погрузить по одной в каждую криопробирку, долить жидкий азот до краев и поместить в каждую криопробирку вторую полоску фольги с апексами.
17. Криопробирки закрыть, перенести их из штатива в заполненный жидким азотом сосуд Дьюара и поставить в морозильник на один час.
18. Поставить в ламинар стерильную одноразовую пластиковую чашку Петри (диаметром 6 см).
19. Налить в чашку Петри 15–25 мл раствора RS при помощи стерильной пипетки Пастера объемом 3–5 мл.
20. Апексы, оставленные в исходной чашке Петри с раствором PVS2, глазным пинцетом перенести в чашку Петри с раствором RS и оставить на 15 мин при комнатной температуре (вариант контроля «← LN»).
21. Через 15 мин контрольные апексы извлечь пинцетом из раствора RS и поместить их в чашку Петри со средой MSTo для посткриогенного восстановления.
22. Чашку Петри закрыть парафилмом, подписать название образца, номер повторности опыта, дату и слово «контроль» или «←LN», обозначая отсутствие этапа погружения эксплантов в жидкий азот.
23. Чашку Петри поставить на светоустановку.
24. По прошествии одного часа криоконсервации в жидком азоте достать из морозильника сосуд Дьюара с криопробирками.
25. Поставить в ламинар пенопластовый штатив для криопробирок.
26. Налить в штатив жидкий азот.
27. Пинцетом достать две криопробирки из сосуда Дьюара и поместить их в штатив, аккуратно открыть криопробирки и долить в них жидкий азот.
28. Быстрым и точным движением пинцета перенести полоски фольги с эксплантами из криопробирки в чашку Петри с раствором RS и оставить на 15 мин при комнатной температуре (вариант «опыт» или «+LN»).
29. Через 15 мин «криоконсервированные» апексы извлечь пинцетом из раствора RS и поместить их в чашку Петри со средой MSTo для посткриогенного восстановления.
30. Чашки Петри закрыть парафилмом, подписать название образца, номер повторности опыта, дату и слово «опыт» или «+LN», обозначая этап погружения эксплантов в жидкий азот.
31. Чашки Петри поставить на светоустановку.

Необходимые материалы и оборудование

- Весы аналитические с точностью до 0.01 г;
- рН-метр;
- электроплитка с водяной баней или микроволновая печь для растворения агара;
- холодильник для хранения рабочих растворов и реактивов;
- автоклав;
- сушижаровые шкафы для сушки и стерилизации посуды;

Показатели посткриогенного восстановления у образцов картофеля, криоконсервация которых была проведена с использованием модифицированного в ВИР метода дроблет-витрификации

№ п/п	Образцы картофеля	Уровень плоидности*	к-ВИР	Контроль (–LN)		Показатели после замораживания–оттаивания (+LN)	
				Жизнеспособность эксплантов, %	Регенерационная способность эксплантов, %	Посткриогенная жизнеспособность эксплантов, %	Посткриогенная регенерационная способность эксплантов, %
Группа А: регенерационная способность образцов после оттаивания выше 40 %							
1	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	1741	100±0.0	100±0.0	96.7±0.8	94.9±0.1
2	<i>S. phureja</i>	2x	15845	86.7±8.9	86.7±8.9	80.1±10.0	75.0±13.3
3	<i>S. phureja</i>	2x	1678	100±0.0	100±0.0	75.0±1.6	73.3±1.6
4	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	2117	71.1±1.5	60.3±8.4	71.1±1.9	71.1±1.9
5	<i>S. stenotomum</i>	2x	9303	100±0.0	100±0.0	81.7±7.5	71.7±1.4
6	<i>S. phureja</i>	2x	9393	80.0±5.8	80.0±5.8	70.0±10.0	70.0±10.0
7	<i>S. stenotomum</i>	2x	10194	83.3±3.3	83.3±3.3	73.9±2.6	69.0±5.5
8	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	8931	83.3±8.8	83.3±8.8	68.3±3.6	66.7±2.8
9	<i>S. phureja</i>	2x	16530	93.3±3.3	93.3±3.3	68.3±2.0	63.3±1.0
10	<i>S. phureja</i>	2x	15843	100±0.0	100±0.0	61.7±1.0	61.7±1.0
11	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	3041	100±0.0	100±0.0	63.3±2.1	61.7±2.1
12	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	12892	100±0.0	100±0.0	60.0±2.0	60.0±2.0
13	<i>S. phureja</i>	2x	22210	90.0±5.8	90.0±5.8	60.0±10.0	60.0±10.0
14	<i>S. stenotomum</i>	2x	9889	80.0±0.0	80.0±0.0	60.2±13.3	60.0±13.3
15	<i>S. tuberosum</i> , сорт Сударыня			93.3±3.3	93.3±3.3	60.0±15.3	60.0±15.3
16	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7523	96.7±3.3	96.7±3.3	60.0±15.5	60.0±15.5
17	<i>S. stenotomum</i>	2x	9039	86.7±3.3	86.7±3.3	60.0±2.9	58.0±5.8
18	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7530	70.0±5.8	70.0±5.8	56.7±2.1	56.7±2.1
19	<i>S. stenotomum</i>	2x	7037	73.3±3.3	73.3±3.3	59.7±4.6	56.5±2.3
20	<i>S. phureja</i>	2x	99	86.7±13.3	86.7±13.3	62.2±12.2	53.3±3.3
21	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7586	90.0±0.0	90.0±0.0	55.0±5.8	53.3±3.3
22	<i>S. tuberosum</i> , сорт Amado			73.3±3.3	73.3±3.3	50.0±10.0	50.0±10.0
23	<i>S. phureja</i>	2x	16530	96.7±3.3	96.7±3.3	50.0±12.3	50.0±12.3
24	<i>S. stenotomum</i>	2x	8880	80.0±0.0	80.0±0.0	48.5±5.5	48.5±5.5
25	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7580	83.3±3.3	83.3±3.3	50.0±3.8	48.0±3.3
26	NZ-32, селекционный клон			83.3±3.3	83.3±3.3	52.0±5.8	47.5±2.4
27	<i>S. stenotomum</i>	2x	8865	73.3±3.3	73.3±3.3	48.1±3.8	46.7±3.3
28	<i>S. stenotomum</i>	2x	11053	73.3±3.3	73.3±3.3	48.0±10.8	46.7±12.0
29	<i>S. tuberosum</i> , сорт Delikat			81.7±4.4	81.7±4.4	50.0±5.8	45.0±5.0
30	<i>S. tuberosum</i> , сорт Forelle			76.7±3.3	76.7±3.3	45.1±13.8	42.8±12.8
31	<i>S. tuberosum</i> , сорт Baltica			80.0±5.8	80.0±5.8	50.0±5.8	42.7±2.7
32	<i>S. tuberosum</i> , сорт Atlantic			73.3±3.3	73.3±3.3	45.0±5.5	42.5±2.5
33	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7529	80.0±5.8	80.0±5.8	40.0±16.0	40.0±16.0
Группа Б: регенерационная способность образцов после оттаивания от 21 до 39 %							
1	<i>S. tuberosum</i> , сорт Rasant			80.0±5.8	80.0±5.8	35.5±5.0	35.5±5.0
2	<i>S. stenotomum</i>	2x	8935	73.3±3.3	73.3±3.3	33.3±1.0	33.3±1.0
3	<i>S. stenotomum</i>	2x	7126	73.3±3.3	73.3±3.3	40.0±5.5	33.3±13.3
4	<i>S. stenotomum</i> (<i>S. yabari</i>)	2x	3640	80.0±0.0	80.0±0.0	61.7±6.4	30.9±10.9
5	<i>S. tuberosum</i> , сорт Solara			78.3±1.7	78.3±1.7	54.0±5.4	30.0±0.1
6	<i>S. stenotomum</i>	2x	10433	80.0±5.8	80.0±5.8	40.0±15.5	30.0±15.3
7	<i>S. tuberosum</i> , сорт Sonate			73.3±3.3	73.3±3.3	35.0±5.3	29.7±0.7
8	<i>S. tuberosum</i> , сорт Maxi			76.7±8.8	76.7±8.8	35.0±5.8	25.0±5.0
9	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	3385	86.7±6.7	86.7±6.7	36.7±3.3	21.1±6.7
10	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	1763	80.0±11.5	80.0±11.5	52.3±2.3	20.0±5.7
Группа В: регенерационная способность образцов после оттаивания ниже 20 %							
1	<i>S. spegazzinii</i>	2x	23061	53.3±6.7	53.3±6.7	36.7±8.8	13.3±3.3

*Cornасно (Gavrilenko et al., 2010).

- ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха;
- стереомикроскоп;
- светоустановки в комнатах с терморегуляцией или климатические камеры;
- сосуд Дьюара объемом 25 л для хранения жидкого азота;
- сосуд Дьюара или термос объемом 0.5–1 л для проведения криоконсервации и переноса криоконсервированного материала в криобанк;
- инструменты и расходные материалы: пинцеты различного размера, препаровальные иглы, скальпели, ножницы, криопробирки объемом 1.8 мл, стерильные мембранные фильтры, жидкий азот.

Результаты

Результаты криоконсервации 44 образцов картофеля, выполненной с использованием модифицированного в ВИР метода дроплет-витрификации, представлены в таблице и на рисунке.

В варианте контроля «–LN» (без погружения апексов в жидкий азот) число жизнеспособных и регенерировавших эксплантов совпадало: фактически все выжившие экспланты были способны к регенерации. Частота регенерации в контроле варьировала от 60.3 до 100 % и существенно не зависела от генотипа. Только у одного образца *S. spagazzinii* отмечен сравнительно низкий уровень регенерации в контроле (53.3 %) (см. таблицу).

Большая часть (76.7 %) изученных образцов культурного картофеля проявила высокую частоту посткриогенной регенерации (40.0–94.9 %) и вошла в группу А (см. таблицу). Группу Б составили 23.3 % образцов культурного картофеля, у которых средняя частота посткриогенного восстановления варьировала от 20 до 35.5 %, что соответствует предельно допустимым минимальным значениям закладки на длительное хранение в криобанк. Наиболее низкая частота регенерации после оттаивания (13.3 %) зафиксирована у образца дикого вида *S. spagazzinii*. Вероятно, для данного образца необходимы дополнительные эксперименты по подбору оптимальных условий криоконсервации. Отметим, что модифицированный в ВИР метод дроплет-витрификации разрабатывался для криоконсервации культурных видов картофеля – аборигенных и селекционных сортов.

Отмечена достоверная положительная корреляция ($0.99; p < 0.05$) между показателями жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов в контроле (–LN), а также статистически значимая положительная корреляция (0.88) между уровнями посткриогенной жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов после замораживания–оттаивания (+LN). Показатели жизнеспособности эксплантов в контроле (–LN) и в варианте криоконсервации (+LN) не коррелировали ($0.55; p > 0.05$), как и показатели регенерационной способности ($0.53; p > 0.05$).

Уровень ploидности и видовая принадлежность образцов культурных видов картофеля не оказывали значимого влияния на частоту посткриогенной регенерации. Существенное ($p < 0.05$) влияние на частоту посткриогенной регенерации после оттаивания оказывал генотип. Группы А и Б сформировались вне зависимости от видовой принадлежности образцов и их уровня ploидности.

Заключение

Существующие методы криоконсервации сортов картофеля не являются универсальными и требуют постоянного совершенствования, что особенно актуально при работе с большими коллекциями, включающими широкое генетическое разнообразие. На сегодняшний день в мировых генбанках для криоконсервации картофеля наиболее широко используется метод дроплет-витрификации, разработанный Б. Панисом (Panis et al., 2005). По сравнению с оригинальным методом предложенные в ВИР модификации позволяют существенно сократить продолжительность экспериментов по криоконсервации, при этом большая часть (76.7 %) изученных образцов культурного картофеля имела высокие показатели посткриогенного восстановления (40–95 %) и у 23.3 % образцов средняя частота посткриогенного восстановления варьировала от 20 до 39 %. В настоящее время модифицированный метод дроплет-витрификации используется в ВИР для расширения криокolleкции культурных видов картофеля.

Список литературы / References

- Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., Швачко Н.А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2007;164:273–285.
- [Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Truskinov E.V., Antonova O.Y., Pendinen G.I., Lupysheva J.V., Rogovaja V.V., Shvachko N.A. A strategy of long-term conservation of vegetatively propagated crops under controlled conditions. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. St. Petersburg, 2007;164:273–285. (in Russian)]
- Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криокolleкциях. СПб.: ВИР, 2011.
- [Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of Vegetatively Propagated Cultures *in vitro* and in Cryocollections. St. Petersburg: VIR Publ., 2011. (in Russian)]
- Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. Биотехнология и селекция растений. 2018;1(1):52–63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63.
- [Ukhatoва Yu.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). Biotechnologiya i Seletsiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding. 2018;1(1):52–63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63. (in Russian)]
- Ухатова Ю.В., Овэс Е.В., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2017;178(3):13–20. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20.
- [Ukhatoва Yu.V., Oves E.V., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Cryoconservation of potato breeding cultivars in VIR. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. St. Petersburg, 2017;178(3):13–20. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20 (in Russian)]
- Филипенко Г.И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР имени Н.И. Вавилова. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2007;164:263–272.
- [Filipenko G.I. Development of the system of low-temperature storage and cryopreservation of plant genetic resources at VIR. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektzii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. St. Petersburg, 2007;164:263–272. (in Russian)]

- Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and its neighboring countries based on the polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(5):489-500. DOI 10.1134/S2079059717050021.
- Bamberg J.B., Martin M.W., Abad J., Jenderek M.M., Tanner J., Donnelly D.J., Nassar M.K., Veilleux R.E., Novy R.G. *In vitro* technology at the US Potato Genebank. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016;52:213-225. DOI 10.1007/s11627-016-9753-x.
- Engelmann F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. *Acta Hort.* 2014;1039:31-39.
- FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome, 2014.
- Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National Potato Collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2010;57(8):1151-1164. DOI 10.1007/s10722-010-9554-8.
- IPGRI. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and applications. Engelmann F., Takagi H. (Eds.). 2000.
- Kaczmarczyk A., Rokka V.M., Keller E.R.J. Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato Res.* 2011;54:45-79. DOI 10.1007/s11540-010-9169-7.
- Keller E.R.J., Sunura A., Leunufna S., Grube M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *J. Refrigeration.* 2006;29:411-417.
- Kim H.H., Yoon J.W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. *CryoLetters.* 2006;27(4):223-234.
- Kushnarenko S., Romadanova N., Aralbayeva M., Zholamanova S., Alexandrova A., Karpova O. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2017;53(4):425-432. DOI 10.1007/s11627-017-9839-0.
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
- Niino T., Valle Arizaga M. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breed. Sci.* 2015;65(1):41-52. DOI 10.1270/jsbbs.65.41.
- Panis B., Piette B., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Sci.* 2005;168:45-55. DOI 10.1016/j.plantsci.2004.07.022.
- Panis B., Van den Houwe I., Swennen R., Rhee J., Roux N. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation. *Indian J. Plant. Genet. Resour.* 2016;29(3):300-302.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation. *CryoLetters.* 2014;35(3):255-266.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015;120:117-125. DOI 10.1007/s11240-014-0585-2.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 1990;9(1):30-33. DOI 10.1007/bf00232130.
- Shvachko N., Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method. In: Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. (Eds.). Cryopreservation of Crop Species in Europe: Proc. of COST Action 871 Final meeting. Angers, France, 2011;135-137.
- Towill L.E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato. *Cryobiology.* 1983;20:567-573.
- Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N.L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2017;53(4):309-317. DOI 10.1007/s11627-017-9846-1.
- Vollmer R., Villagaray R., Egusquiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N.A., Ellis D. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP): a model for long term conservation of clonal plant genetic resources collections of the future. *CryoLetters.* 2016;37(5):318-329.
- Yoon J.W., Kim H.H., Ko H.C., Hwang H.S., Hong E.S., Cho E.G., Engelmann F. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters.* 2006;27(4):211-222.

ORCID ID

T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569
Yu.V. Ukhatoeva orcid.org/0000-0001-9366-0216

Благодарности. Исследование способности к посткриогенному восстановлению 44 образцов картофеля выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-04125). *In vitro* коллекцию картофеля, образцы которой были использованы для криоконсервации, поддерживали в рамках программы 0662-2019-0004. Фотография изолированного экспланта (см. рисунок, в) выполнена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.12.2018. После доработки 24.02.2019. Принята к публикации 24.02.2019.

Использование метода путевых коэффициентов S. Wright для статистического анализа системы взаимосвязанных признаков риса

Д.П. Паламарчук¹, М.Р. Козаченко², С.И. Святченко² ✉

¹ Институт риса Национальной академии аграрных наук Украины, с. Антоновка, Скадовский район, Херсонская область, Украина

² Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, Украина

✉ e-mail: yurievregion@gmail.com

В настоящее время актуален путевой анализ S. Wright продуктивности растений. Целью исследований было определить парные коэффициенты корреляций и путевые коэффициенты S. Wright признаков сортов риса и на их основе выявить вклад каждого из них в продуктивность растения. Исходным материалом были 10 сортов риса. Эксперименты проведены в 2013, 2014 и 2016 гг. в условиях орошения на опытном поле Института риса Национальной академии аграрных наук Украины. Посев осуществляли сеялкой СКС-6А с нормой высева 7.0 млн всхожих семян на 1 га. Предшественник – люцерна. Площадь делянки – 5 м², междурядья – 15 см. Анализировали растения по признакам: продуктивность (масса зерна) растения, масса всей метелки, масса зерна с боковых стеблей, продуктивная кустистость, количество зерен в метелке, количество колосков в метелке, масса 1000 зерен, масса зерна с метелки, высота растения, длина и плотность метелки, количество пустых колосков в метелке, пустозерность. Парные коэффициенты корреляций определяли по методике Б.А. Доспехова, путевой анализ – по методике S. Wright по работе А.И. Седловского, С.П. Мартынова и Л.К. Мамонова (1982). Определена корреляция продуктивности с 12 количественными признаками риса: тесная – с массой зерна с боковых стеблей; средняя – с массой всей метелки и с массой зерна с метелки. Согласно путевому анализу продуктивности растений, корреляция признаков растений с продуктивностью зависит как от прямых, так и от косвенных эффектов влияния каждого признака на продуктивность. Установлен относительный вклад влияния каждого из 12 исследуемых признаков на продуктивность риса, как прямой (непосредственный), так и косвенный (побочный) эффекты их при взаимодействии с другими признаками. Это дало возможность раскрыть причины и следствия взаимозависимостей между признаками и выделить селекционно-ценные для отбора признаки, такие как масса всей метелки и продуктивная кустистость, которые имели наибольший прямой эффект влияния на продуктивность и достоверную корреляцию с ней.

Ключевые слова: рис; сорт; признак; продуктивность растения; корреляция; путевой анализ; вклад количественного признака в продуктивность; селекционное значение признака.

Для цитирования: Паламарчук Д.П., Козаченко М.Р., Святченко С.И. Использование метода путевых коэффициентов S. Wright для статистического анализа системы взаимосвязанных признаков риса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):430-438. DOI 10.18699/VJ19.511

Use of S. Wright's path coefficient method for statistical analysis of interrelated traits in rice

D.P. Palamarchuk¹, M.R. Kozachenko², S.I. Sviatchenko² ✉

¹ Institute of Rice, NAAS of Ukraine, Antonovka, Skadovskiy district, Kherson region, Ukraine

² Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuriev, NAAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine

✉ e-mail: yurievregion@gmail.com

S. Wright's analysis of plant productivity is of great current interest. The research objective was to determine the pair correlation coefficients and S. Wright's path coefficients for rice varieties and, on their basis, to identify the contribution of each of them to the plant productivity. Ten rice varieties were taken as the test material. The experiments were conducted in the irrigated experimental field of the Institute of Rice of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine in 2013, 2014 and 2016. Seeds were sown with an SKS-6A manual seeder; the seeding rate was 7.0 mln germinable seeds per hectare. The predecessor was alfalfa. The plot area was 5 m²; the sowing distance was 15 cm. The plants were analyzed for the following traits: plant productivity (grain weight), panicle weight, grain weight from side stems, productive tillering capacity, grain number per panicle, spikelet number per panicle, 1000-grain weight, grain weight per panicle, plant height, panicle length and density, empty spikelet number per panicle, and incidence of blind seed disease. Pair correlation coefficients were determined by B.A. Dospekhov's method; path analysis, by S. Wright's method. The correlations of productivity with 12 quantitative traits of rice were determined: the correlation was close with the grain weight from side stems and medium with the panicle weight and with the grain weight per panicle. Path analysis of the plant productivity established that the correlations of plant traits with

the productivity depended both on direct and indirect effects of each trait on the productivity. The relative contribution of each of the studied 12 traits to the rice productivity was determined; both direct and indirect effects of their interactions with other traits were evaluated. This made it possible to discover causes and consequences of interrelations between the traits and, as a result, to choose valuable-for-selection traits, such as panicle weight and productive tillering capacity, which had the greatest direct effects on the productivity and significant correlations with it. Key words: rice; variety; trait; plant productivity; correlation; path analysis; contribution of a quantitative trait to the productivity; selection value of the trait.

For citation: Palamarchuk D.P., Kozachenko M.R., Sviatchenko S.I. Use of S. Wright's path coefficient method for statistical analysis of interrelated traits in rice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):430-438. DOI 10.18699/VJ19.511 (in Russian)

Введение

Эффективность использования исходного материала в селекции зависит от возможности установить особенности количественных признаков растений, основным из которых является продуктивность, или масса зерна с растения. На уровень продуктивности влияют как условия внешней среды, так и генотипические особенности характера проявления отдельных признаков исследуемых объектов. В связи с этим селекционную оценку сортов целесообразно проводить не по отдельным признакам, а с учетом их взаимозависимости, определяемой методом корреляционного анализа. Это позволяет узнать, в какой степени изменяется основной признак, в частности продуктивность растения, в зависимости от значений других признаков, в результате чего возможен прогноз эффективности отбора уже по ним.

На важность установления корреляций различных признаков растений для определения эффективности отбора по отдельным из них в разных условиях, на целесообразность отбора по их комплексу, выделения отдельных признаков (характеристик) с наибольшим вкладом в изменчивость основного признака указывали многие авторы на примере таких культур, как рис (Samonte et al., 1998; Sürek, Beşer, 2003; Орлюк и др., 2008, 2011; Khan et al., 2009; Akinwale et al., 2011; Шпак, 2013; Hossain et al., 2015; Ratna et al., 2015) и ячмень (Bhutta et al., 2005; Ataеi, 2006; Ilker, 2006; Emine, Necmettin, 2012; Akdeniz et al., 2014).

При определении простой парной корреляции не всегда можно выявить влияние отдельных признаков. Существенное значение могут иметь косвенные эффекты других признаков. То есть парные коэффициенты корреляции хотя и важны для определения основных компонентов влияния на показатели основного признака, однако не дают полного представления о значении прямых и косвенных воздействий отдельных признаков.

Поэтому для определения вклада каждого из количественных признаков в основную, например продуктивность растения, непосредственно (прямые эффекты) и при взаимодействии с другими признаками (непрямые, косвенные, побочные эффекты) используют так называемый путевой анализ S. Wright. Это эффективный метод статистического анализа причин и следствий в системе взаимозависимых признаков. Таким образом определяют детерминантные признаки как критерии отбора, по которым он будет эффективным, на что указано в некоторых работах по рису (Samonte et al., 1998; Ekka et al., 2011), ячменю (Sinebo, 2002) и пшенице (Finne et al., 2000).

Путевой метод в селекции растений для анализа продуктивности в зависимости от других признаков растений

впервые был использован в 1959 г. D.R. Dewey и К.Н. Лу (Седловский и др., 1982). Ряд исследователей использовали анализ коэффициентов путей S. Wright и коэффициентов корреляции для объяснения взаимосвязей между количественными признаками различных растений, в частности риса (Samonte et al., 1998; Sürek, Beşer, 2003; Akhtar et al., 2011; Bagheri et al., 2011; Basavaraja et al., 2011; Bhadru et al., 2011; Ekka et al., 2011; Mugemangango Cyprien, Vinod Kumar, 2011; Haider et al., 2012; Hossain et al., 2015), ячменя (Ataеi, 2006; Мухордова, 2011) и пшеницы (Мухордова, Калашник, 2010; Мухордова, 2014).

Были установлены неодинаковые уровни прямых эффектов признаков растений на продуктивность сортов различных культур: для индекса продуктивности риса (Sürek, Beşer, 2003), количества зерен в колосе ячменя (Ataеi, 2006) и пшеницы (Shahid et al., 2002), высоты растений пшеницы (Aycicek, Yildirim, 2006). Необходимость изучения взаимосвязей структурных элементов растений методом путевого анализа отмечена также в исследованиях на бобах (Türk et al., 2008) и сое (Сичкар, 1998). Таким образом, в разных исследованиях говорится о целесообразности определения взаимосвязи между основным и другими признаками растений с использованием не только парных коэффициентов корреляции, но и путевых коэффициентов для нахождения прямых и косвенных эффектов взаимосвязанных признаков.

Целью настоящей работы было установить особенности взаимосвязей между количественными признаками растений риса путем определения парных коэффициентов корреляции и путевых коэффициентов, по которым выявить прямое и косвенное влияние различных признаков на продуктивность растения, на основе чего определить их селекционное значение.

Материалы и методы

Исследования выполнены в 2013, 2014 и 2016 гг. в отделе селекции и на опытном поле Института риса Национальной академии аграрных наук Украины в различных погодных условиях. Гидротермический коэффициент Селянинова в 2013 г. составил 0,9, в 2014 г. – 0,9, в более благоприятном 2016 г. – 1,2.

Материалом для исследований служили 10 лучших сортов риса: Командор, Южанин, Украина 96, Magic, Lotto, Виконт, Адмирал, Fukushima, Giza-177, Sakha 101. Растения были выращены в сортоиспытании в условиях орошения.

Орошение проведено по типу укороченного затопления. После посева риса чеки сразу заливали водой на 5 дней, после чего почву в чеках подсушивали до получения пол-

ных всходов. Второе затопление чеков начинали после получения полных всходов и начала роста растений риса и по мере их развития поднимали слой воды до уровня 15 см, после чего поддерживали его на этой отметке до полной спелости посевов.

Против сорняков в посевах риса применяли гербицид Цитадель 25 ЕД м.д. нормой 1.6 л/га с использованием опрыскивателя ОБМ-630. Против пирикулярноза посевы обрабатывали фунгицидом Импакт К в количестве 1.6 л/га.

Перед дискованием пласта люцерны весной, в первой декаде апреля, вносили удобрения N90 (сульфат аммония) и P20 (суперфосфат простой). Подкормку растений риса проводили карбамидом (мочевина) в фазу кущения нормой N50 действующего вещества на 1 га. Предшественником была люцерна.

Посев осуществляли сеялкой СКС-6А с нормой высева 4.5 млн всхожих семян на 1 га. В 2013 г. к уборке сохранилось 101–105 растений на 1 га, в 2014 г. – 96–100, в 2016 г. – 93–98 растений на 1 га.

Площадь делянки – 5 м², количество рядков – 6, между-рядья – 12.5 см. Количество повторений – 4. Урожай собирали селекционным комбайном Yanmar.

Структурный анализ по 50 растениям (с корнями) делали по 13 признакам для всех 10 сортов без исключения: продуктивность (масса зерна) растения, масса всей метелки, масса зерна с боковых стеблей, продуктивная кустистость, количество зерен в метелке, количество колосков в метелке, масса 1000 зерен, масса зерна с метелки, высота растения, длина и плотность метелки, количество пустых колосков в метелке, пустозерность.

Парные коэффициенты корреляций (r) определяли между всеми 13 количественными признаками с использованием основ статистической обработки по (Доспехов, 1973). Путевой анализ проводили в соответствии с методикой S. Wright по работе А.Н. Седловского, С.П. Мартынова и Л.К. Мамонова (Седловский и др., 1982). Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Excel персонального компьютера.

Зависимость продуктивности от других признаков можно выразить через уравнение множественной регрессии

$$Y = Y_c + b_1 \cdot (X_1 - X_{1c}) + b_2 \cdot (X_2 - X_{2c}) + \dots + b_n \cdot (X_n - X_{nc}) + E, \quad (1)$$

где Y – продуктивность; Y_c – средняя статистическая продуктивность; X_1, X_2, X_n – значения 1-го, 2-го и n -го признаков соответственно; X_{1c}, X_{2c}, X_{nc} – среднее статистическое значение 1-го, 2-го и n -го признаков соответственно; b_1 – коэффициент регрессии X_1 на Y ; b_2 – коэффициент регрессии X_2 на Y ; b_n – коэффициент регрессии X_n на Y ; E – общая ошибка уравнения, которая включает и ошибку опыта.

Затем вводятся обозначения:

$y = Y - Y_c$; $x_1 = X_1 - X_{1c}$; $x_2 = X_2 - X_{2c}$; ...; $x_n = X_n - X_{nc}$, а также рекомендованные изменения признаков от деления их на свои стандартные отклонения σ_i :

$$x_i = (X_i - X_{ic}) / \sigma_i \text{ для } i = 1, 2, \dots, n, \quad (2)$$

где n – общее количество признаков, влияющих на продуктивность.

Тогда уравнение (1) принимает вид

$$y / \sigma_y = b_1 \cdot (\sigma_1 / \sigma_y) \cdot (x_1 / \sigma_1) + b_2 \cdot (\sigma_2 / \sigma_y) \cdot (x_2 / \sigma_2) + \dots + b_n \cdot (\sigma_n / \sigma_y) \cdot (x_n / \sigma_n) + \sigma_e / \sigma_y \cdot (E / \sigma_e). \quad (3)$$

Величину $P_i = b_i \cdot (\sigma_i / \sigma_y)$ называют коэффициентом пути признака x_i к зависимой переменной y (в нашем случае – продуктивность). Таким образом, путевой коэффициент S. Wright (Райта) – это стандартизированный коэффициент регрессии независимого признака на зависимую функцию.

В отличие от коэффициента корреляции, путевой коэффициент является векторной величиной, т. е. имеет направление в системе признаков. Для нахождения значений путевых коэффициентов необходимо сначала рассчитать парные коэффициенты корреляций между признаками.

Результаты

Установлены парные коэффициенты корреляций количественных признаков риса и путевые коэффициенты продуктивности растений.

Корреляция количественных признаков риса

Установлен уровень взаимосвязей между 13 количественными признаками всех 10 сортов риса в 2013, 2014 и 2016 гг. по парным коэффициентам корреляции (табл. 1).

Основной признак растения – продуктивность (масса зерна) – достоверно положительно и очень тесно коррелировал во все три года с массой зерна с боковых стеблей ($r = 0.99^*$; $r = 0.99^*$; $r = 0.99^*$; здесь и далее значения коэффициента корреляции r приведены для 2013, 2014 и 2016 гг. соответственно), т. е. отбор по этому признаку будет наиболее эффективным, средне – с массой зерна с метелки ($r = 0.40^*$; $r = 0.60^*$; $r = 0.56^*$), массой всей метелки ($r = 0.49^*$; $r = 0.60^*$; $r = 0.56^*$) и кустистостью ($r = 0.55^*$; $r = 0.32$; $r = 0.34$), однако отрицательно коррелировал с количеством пустых колосков ($r = -0.12$; $r = -0.25$; $r = -0.44^*$) и пустозерностью ($r = -0.14$; $r = -0.22$; $r = -0.45^*$).

Продуктивность (масса зерна) метелки как один из структурных элементов продуктивности растения имела очень тесную положительную корреляцию с массой всей метелки ($r = 0.99^*$; $r = 0.99^*$; $r = 0.99^*$) и массой зерна с боковых стеблей ($r = 0.90^*$; $r = 0.87^*$; $r = 0.89^*$), по которым отбор будет наиболее эффективным, среднюю – с продуктивностью растения ($r = 0.40^*$; $r = 0.60^*$; $r = 0.56^*$), количеством зерен в метелке ($r = 0.53^*$; $r = 0.61^*$; $r = 0.78^*$) и количеством колосков в метелке ($r = 0.53^*$; $r = 0.61^*$; $r = 0.78^*$), однако отрицательную – с продуктивной кустистостью ($r = -0.36$; $r = -0.50^*$; $r = -0.22$) и пустозерностью ($r = -0.33$; $r = -0.32$; $r = -0.41^*$).

Продуктивная кустистость средне коррелировала с массой зерна с боковых стеблей ($r = 0.66^*$; $r = 0.56^*$; $r = 0.46^*$) и продуктивностью растений ($r = 0.55^*$; $r = 0.32$; $r = 0.34$), а отрицательно (достоверно в 2014 г.) – с массой всей метелки ($r = -0.25$; $r = -0.50^*$; $r = -0.22$), количеством колосков в метелке ($r = -0.24$; $r = -0.41^*$; $r = -0.26$), количеством зерен в метелке ($r = -0.24$; $r = -0.41^*$; $r = 0.25$) и массой зерна с метелки ($r = -0.36$; $r = -0.50^*$; $r = -0.22$).

Длина метелки имела положительную корреляцию с массой зерна с боковых стеблей ($r = 0.94^*$; $r = 0.89^*$;

Таблица 1. Коэффициенты корреляции количественных признаков 10 сортов риса

№	Год	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	2013	0.13	0.16	0.27	0.31	0.39	-0.07	-0.06	0.01	0.14	0.21	-0.04	-0.23
	2014	-0.12	0.04	-0.05	-0.03	0.31	-0.06	-0.06	0.01	0.04	0.01	-0.02	-0.20
	2016	-0.09	0.47*	-0.06	0.08	0.54*	0.10	0.12	-0.06	0.47*	0.53*	-0.07	-0.26
2	2013		-0.25	0.66	0.55*	0.18	-0.24	-0.24	0.23	-0.36	-0.01	0.23	-0.31
	2014		-0.50*	0.56*	0.32	-0.15	-0.41*	-0.41*	0.42*	-0.50*	0.08	0.39	-0.32
	2016		-0.22	0.46*	0.34	0.03	-0.26	-0.25	0.12	-0.22	0.08	0.18	-0.21
3	2013			0.15	0.49*	-0.24	0.52*	0.52*	-0.55*	0.99*	0.22	-0.54*	0.64*
	2014			0.36	0.60*	0.04	0.61*	0.61*	-0.57*	1.00*	0.03	-0.51*	0.55*
	2016			0.32	0.56*	0.22	0.64*	0.78*	-0.63*	1.00*	0.34	-0.68*	0.38
4	2013				0.99*	0.94*	0.96*	0.96*	0.94*	0.90*	0.95*	0.92*	0.97*
	2014				0.99*	0.89*	0.93*	0.92*	0.90*	0.87*	0.87*	0.86*	0.92*
	2016				0.99*	0.96*	0.98*	0.98*	0.97*	0.89*	0.98*	0.97*	0.95*
5	2013					-0.04	0.07	0.07	-0.12	0.40*	0.22	-0.14	0.14
	2014					-0.07	0.27	0.27	-0.25	0.60*	0.11	-0.22	0.28
	2016					-0.01	0.39	0.50*	-0.44*	0.56*	0.14	-0.45*	0.32
6	2013						0.11	0.12	-0.16	-0.25	-0.34	-0.17	-0.40*
	2014						0.15	0.15	-0.13	0.04	-0.13	-0.11	-0.33
	2016						0.14	0.06	0.09	0.22	0.13	0.05	-0.56*
7	2013							0.99*	-0.94*	0.53*	-0.66*	-0.87*	0.84*
	2014							0.99*	-0.91*	0.61*	-0.59*	-0.81*	0.87*
	2016							0.90*	-0.28	0.64*	-0.38	-0.42*	0.73*
8	2013								-0.96*	0.53*	-0.66*	-0.89*	0.84*
	2014								-0.93*	0.61*	-0.62*	-0.84*	0.87*
	2016								-0.68*	0.78*	-0.31	-0.78*	0.70*
9	2013									-0.34	0.39	0.61*	-0.48*
	2014									-0.36	0.47*	0.60*	-0.52*
	2016									-0.37	0.03	0.57*	-0.19
10	2013										0.12	-0.33	0.39
	2014										0.02	-0.32	0.35
	2016										0.20	-0.41*	0.24
11	2013											0.37	-0.23
	2014											0.49*	-0.34
	2016											0.08	-0.24
12	2013												-0.44*
	2014												-0.46*
	2016												-0.24

Примечания. № – номер признака; 1 – высота растения; 2 – кустистость; 3 – масса метелки; 4 – масса зерна с боковых стеблей; 5 – продуктивность (масса зерна с растения); 6 – длина метелки; 7 – количество колосков в метелке; 8 – количество зерен в метелке; 9 – количество пустых колосков в метелке; 10 – масса зерна с метелки; 11 – масса 1 000 зерен; 12 – пустозерность; 13 – плотность метелки. * Коэффициент корреляции существенен при уровне значимости 5 %.

$r = 0.96^*$), однако отрицательную – с плотностью метелки ($r = -0.40^*$; $r = -0.33$; $r = -0.56^*$).

Количество зерен в метелке положительно коррелировало с плотностью метелки ($r = 0.84^*$; $r = 0.87^*$; $r = 0.70^*$), массой зерна с боковых стеблей ($r = 0.96^*$; $r = 0.92^*$; $r = 0.98^*$) и количеством колосков в метелке ($r = 0.99^*$; $r = 0.99^*$; $r = 0.90^*$), среднее – с продуктивностью метелки ($r = 0.53^*$; $r = 0.61^*$; $r = 0.78^*$), а отрицательно – с коли-

чеством пустых колосков в метелке ($r = -0.96^*$; $r = -0.93^*$; $r = -0.68^*$), пустозерностью ($r = -0.89^*$; $r = 0.84^*$; $r = 0.78^*$) и массой 1 000 зерен ($r = -0.66^*$; $r = -0.62^*$; $r = -0.31$).

Масса 1 000 зерен имела положительную корреляцию с массой зерна с боковых стеблей ($r = 0.95^*$; $r = 0.87^*$; $r = 0.98^*$), однако отрицательную – с количеством колосков в метелке ($r = -0.66^*$; $r = -0.59^*$; $r = -0.38$) и количеством зерен в метелке ($r = -0.66^*$; $r = -0.62^*$; $r = -0.31$).

В результате определения парных коэффициентов корреляции установлено, что продуктивность растения, масса зерна с метелки, масса зерна с боковых стеблей положительно взаимосвязаны между собой.

Положительная связь получена также между массой метелки, количеством зерен в метелке и плотностью метелки, между массой зерна с метелки, количеством зерен и количеством колосков в метелке, между массой зерна с боковых стеблей и количеством колосков в метелке и плотностью метелки. Пустозерность отрицательно влияет на массу, количество зерен и колосков в метелке и через эти признаки – на плотность метелки.

Путевой анализ продуктивности растений риса

Для определения путевых коэффициентов (P_j) мы воспользовались линейным уравнением

$$\sum r_{ij} \cdot P_j = r_{yi}, \quad (4)$$

где P_j – путевой коэффициент от j -го признака к y ; r_{ij} – коэффициент корреляции между i -м и j -м признаками; r_{yi} – коэффициент корреляции между y и i -м признаком.

Затем с использованием значений коэффициентов корреляции за 2013 г. была составлена система из двенадцати уравнений (4) с двенадцатью неизвестными путевыми коэффициентами (прямыми эффектами признаков): P_1 (высоты растения), P_2 (кустистости), P_3 (массы метелки), P_4 (массы зерна с боковых стеблей), P_5 (длины метелки), P_6 (количества колосков в метелке), P_7 (количества зерен в метелке), P_8 (количества пустых колосков в метелке), P_9 (массы зерна с метелки), P_{10} (массы 1000 зерен), P_{11} (пустозерности), P_{12} (плотности метелки) (см. рисунок).

С помощью доступного в интернете метода Гаусса (<https://planetcalc.ru/3571/>) было найдено решение этой

системы линейных алгебраических уравнений, заданных в виде матрицы. Решением является вектор путевых коэффициентов за 2013 г. Аналогично мы получили вектор путевых коэффициентов за 2014 и 2016 гг. (табл. 2).

Подставив значения прямых эффектов P_j ($j = 1, 2, \dots, 12$), с помощью табличного компьютерного процессора Excel получили разложение корреляции между продуктивностью и каждым количественным признаком на прямой его эффект и косвенные эффекты других признаков всех 10 сортов (табл. 3).

Результаты были сведены в таблицу – матрицу путевых коэффициентов каждого признака к продуктивности растения: прямых эффектов каждого из них на продуктивность и побочных эффектов других признаков, которые составляют причинно-следственную систему. Структура матрицы соответствует системе двенадцати уравнений с 12 прямыми эффектами.

В результате путевого анализа продуктивности установлены прямые эффекты 12 признаков в их вкладе в уровень продуктивности (по центральной диагонали табл. 3), их косвенный эффект в связях продуктивности с другими признаками (по вертикали каждого из признаков, см. табл. 3), а также косвенный эффект других признаков в связях каждого из 12 признаков в отдельности с продуктивностью (по горизонтали каждого из признаков, см. табл. 3).

Наибольший прямой эффект на продуктивность (см. табл. 3) за 2013, 2014 и 2016 гг. наблюдался у признака «масса всей метелки» (0.51; 0.95; 0.75 соответственно по годам). Его косвенный эффект (по вертикали табл. 3) был положительным в связях продуктивности с высотой растения в 2016 г., массой зерна с боковых стеблей (2014, 2016 гг.), количеством колосков в метелке, количеством зе-

$$\begin{cases} 1.00 \cdot P_1 + 0.13 \cdot P_2 + 0.16 \cdot P_3 + 0.27 \cdot P_4 + 0.39 \cdot P_5 - 0.07 \cdot P_6 - 0.06 \cdot P_7 + 0.01 \cdot P_8 + 0.14 \cdot P_9 + 0.21 \cdot P_{10} - 0.04 \cdot P_{11} - 0.23 \cdot P_{12} = 0.31 \\ 0.13 \cdot P_1 + 1.00 \cdot P_2 - 0.25 \cdot P_3 + 0.66 \cdot P_4 + 0.18 \cdot P_5 - 0.24 \cdot P_6 - 0.24 \cdot P_7 + 0.23 \cdot P_8 - 0.36 \cdot P_9 - 0.01 \cdot P_{10} + 0.23 \cdot P_{11} - 0.31 \cdot P_{12} = 0.55 \\ 0.16 \cdot P_1 - 0.25 \cdot P_2 + 1.00 \cdot P_3 + 0.15 \cdot P_4 - 0.24 \cdot P_5 + 0.52 \cdot P_6 + 0.52 \cdot P_7 - 0.55 \cdot P_8 + 0.99 \cdot P_9 + 0.22 \cdot P_{10} - 0.54 \cdot P_{11} + 0.64 \cdot P_{12} = 0.49 \\ 0.27 \cdot P_1 + 0.66 \cdot P_2 + 0.15 \cdot P_3 + 1.00 \cdot P_4 - 0.94 \cdot P_5 + 0.96 \cdot P_6 + 0.96 \cdot P_7 + 0.94 \cdot P_8 + 0.90 \cdot P_9 + 0.95 \cdot P_{10} + 0.92 \cdot P_{11} + 0.97 \cdot P_{12} = 0.99 \\ 0.39 \cdot P_1 + 0.18 \cdot P_2 - 0.24 \cdot P_3 + 0.94 \cdot P_4 + 1.00 \cdot P_5 + 0.11 \cdot P_6 + 0.12 \cdot P_7 - 0.16 \cdot P_8 - 0.25 \cdot P_9 - 0.34 \cdot P_{10} - 0.17 \cdot P_{11} + 0.40 \cdot P_{12} = -0.04 \\ -0.07 \cdot P_1 - 0.24 \cdot P_2 + 0.52 \cdot P_3 + 0.96 \cdot P_4 + 0.11 \cdot P_5 + 1.00 \cdot P_6 + 0.99 \cdot P_7 - 0.94 \cdot P_8 + 0.53 \cdot P_9 - 0.66 \cdot P_{10} - 0.87 \cdot P_{11} + 0.84 \cdot P_{12} = 0.07 \\ -0.06 \cdot P_1 - 0.24 \cdot P_2 + 0.52 \cdot P_3 + 0.96 \cdot P_4 + 0.12 \cdot P_5 + 0.99 \cdot P_6 + 1.00 \cdot P_7 - 0.96 \cdot P_8 + 0.53 \cdot P_9 - 0.66 \cdot P_{10} - 0.89 \cdot P_{11} + 0.84 \cdot P_{12} = 0.07 \\ 0.01 \cdot P_1 + 0.23 \cdot P_2 - 0.55 \cdot P_3 + 0.94 \cdot P_4 - 0.16 \cdot P_5 - 0.94 \cdot P_6 - 0.96 \cdot P_7 + 1.00 \cdot P_8 - 0.34 \cdot P_9 + 0.39 \cdot P_{10} + 0.61 \cdot P_{11} - 0.48 \cdot P_{12} = -0.12 \\ 0.14 \cdot P_1 - 0.36 \cdot P_2 + 0.99 \cdot P_3 + 0.90 \cdot P_4 - 0.25 \cdot P_5 + 0.53 \cdot P_6 + 0.53 \cdot P_7 - 0.34 \cdot P_8 + 1.00 \cdot P_9 + 0.12 \cdot P_{10} - 0.33 \cdot P_{11} + 0.39 \cdot P_{12} = 0.40 \\ 0.21 \cdot P_1 - 0.01 \cdot P_2 + 0.22 \cdot P_3 + 0.95 \cdot P_4 - 0.25 \cdot P_5 - 0.66 \cdot P_6 - 0.66 \cdot P_7 + 0.39 \cdot P_8 + 0.12 \cdot P_9 + 1.00 \cdot P_{10} + 0.37 \cdot P_{11} - 0.23 \cdot P_{12} = 0.22 \\ -0.04 \cdot P_1 + 0.23 \cdot P_2 - 0.54 \cdot P_3 + 0.92 \cdot P_4 - 0.17 \cdot P_5 - 0.87 \cdot P_6 - 0.89 \cdot P_7 + 0.61 \cdot P_8 - 0.33 \cdot P_9 + 0.37 \cdot P_{10} + 1.00 \cdot P_{11} - 0.44 \cdot P_{12} = -0.14 \\ -0.23 \cdot P_1 - 0.31 \cdot P_2 + 0.64 \cdot P_3 + 0.97 \cdot P_4 - 0.40 \cdot P_5 + 0.84 \cdot P_6 + 0.84 \cdot P_7 - 0.48 \cdot P_8 + 0.39 \cdot P_9 - 0.23 \cdot P_{10} - 0.44 \cdot P_{11} + 1.00 \cdot P_{12} = 0.14 \end{cases}$$

Система из двенадцати уравнений с двенадцатью неизвестными, 2013 г.

Таблица 2. Путевые коэффициенты (P_j) j -го признака к продуктивности всех 10 сортов (y)

Год	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6	P_7	P_8	P_9	P_{10}	P_{11}	P_{12}
2013	0.12	0.72	0.51	-0.01	-0.02	-0.01	0.09	0.08	0.11	0.11	0.02	0.02
2014	0.03	0.85	0.95	-0.01	0.01	-0.06	0.16	0.01	0.03	0.08	-0.01	-0.01
2016	-0.17	0.52	0.75	-0.03	0.25	-0.73	0.42	0.13	0.12	-0.17	0.09	0.47

Таблица 3. Результаты путевого анализа продуктивности изучаемых 10 сортов риса

№	Год	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	P ₀	13
1	2013	0.1200	0.0936	0.0816	-0.0027	-0.0078	0.0007	-0.0054	0.0008	0.0154	0.0231	-0.0008	-0.0046	-0.0039	0.31
	2014	0.0300	-0.1020	0.0380	0.0005	0.0031	0.0036	-0.0096	0.0001	0.0012	0.0008	0.0002	0.0020	0.0021	-0.03
	2016	-0.1700	-0.0468	0.3525	0.0018	0.1350	-0.0730	0.0504	-0.0078	0.0564	-0.0901	-0.0063	-0.1222	0.0001	0.08
2	2013	0.0156	0.7200	-0.1275	-0.0066	-0.0036	0.0024	-0.0216	0.0184	-0.0396	-0.0011	0.0046	-0.0062	-0.0048	0.55*
	2014	-0.0036	0.8500	-0.4750	-0.0056	-0.0015	0.0246	-0.0656	0.0042	-0.0150	0.0064	-0.0039	0.0032	0.0018	0.32
	2016	0.0153	0.5200	-0.1650	-0.0138	0.0075	0.1898	-0.1050	0.0156	-0.0264	-0.0136	0.0162	-0.0987	-0.0019	0.34
3	2013	0.0192	-0.1800	0.5100	-0.0015	0.0048	-0.0052	0.0468	-0.0440	0.1089	0.0242	-0.0108	0.0128	0.0048	0.49*
	2014	0.0012	-0.4250	0.9500	-0.0036	0.0004	-0.0366	0.0976	-0.0057	0.0300	0.0024	0.0051	-0.0055	-0.0103	0.60*
	2016	-0.0799	-0.1144	0.7500	-0.0096	0.0550	-0.4672	0.3276	-0.0819	0.1200	-0.0578	-0.0612	0.1786	0.0008	0.56*
4	2013	0.0324	0.4752	0.0765	-0.0100	-0.0188	-0.0096	0.0864	0.0752	0.0990	0.1045	0.0184	0.0194	0.0414	0.99*
	2014	-0.0015	0.4760	0.3420	-0.0100	0.0089	-0.0558	0.1472	0.0090	0.0261	0.0696	-0.0086	-0.0092	-0.0037	0.99*
	2016	0.0102	0.2392	0.2400	-0.0300	0.2400	-0.7154	0.4116	0.1261	0.1068	-0.1666	0.0873	0.4465	-0.0057	0.99*
5	2013	0.0468	0.1296	-0.1224	-0.0094	-0.0200	-0.0011	0.0108	-0.0128	-0.0275	-0.0374	-0.0034	-0.0080	0.0148	-0.04
	2014	0.0093	-0.1275	0.0380	-0.0089	0.0100	-0.0090	0.0240	-0.0013	0.0012	-0.0104	0.0011	0.0033	0.0002	-0.07
	2016	-0.0918	0.0156	0.1650	-0.0288	0.2500	-0.1022	0.0252	0.0117	0.0264	-0.0221	0.0045	-0.2632	-0.0003	-0.01
6	2013	-0.0084	-0.1728	0.2652	-0.0096	-0.0022	-0.0100	0.0891	-0.0752	0.0583	-0.0726	-0.0174	0.0168	0.0088	0.07
	2014	-0.0018	-0.3485	0.5795	-0.0093	0.0015	-0.0600	0.1584	-0.0091	0.0183	-0.0472	0.0081	-0.0087	-0.0112	0.27
	2016	-0.0170	-0.1352	0.4800	-0.0294	0.0350	-0.7300	0.3780	-0.0364	0.0768	0.0646	-0.0378	0.3431	-0.0017	0.39
7	2013	-0.0072	-0.1728	0.2652	-0.0096	-0.0024	-0.0099	0.0900	-0.0768	0.0583	-0.0726	-0.0178	0.0168	0.0088	0.07
	2014	-0.0018	-0.3485	0.5795	-0.0092	0.0015	-0.0594	0.1600	-0.0093	0.0183	-0.0496	0.0084	-0.0087	-0.0112	0.27
	2016	-0.0204	-0.1300	0.5850	-0.0294	0.0150	-0.6570	0.4200	-0.0884	0.0936	0.0527	-0.0702	0.3290	0.0001	0.50*
8	2013	0.0012	0.1656	-0.2805	-0.0094	0.0032	0.0094	-0.0864	0.0800	-0.0374	0.0429	0.0122	-0.0096	-0.0112	-0.12
	2014	0.0003	0.3570	-0.5415	-0.0090	-0.0013	0.0546	-0.1488	0.0100	-0.0108	0.0376	-0.0060	0.0052	0.0027	-0.25
	2016	0.0102	0.0624	-0.4725	-0.0291	0.0225	0.2044	-0.2856	0.1300	-0.0444	-0.0051	0.0513	-0.0893	0.0052	-0.44*
9	2013	0.0168	-0.2592	0.5049	-0.0090	0.0050	-0.0053	0.0477	-0.0272	0.1100	0.0132	-0.0066	0.0078	0.0019	0.40
	2014	0.0012	-0.4250	0.9500	-0.0087	0.0004	-0.0366	0.0976	-0.0036	0.0300	0.0016	0.0032	-0.0035	-0.0066	0.60*
	2016	-0.0799	-0.1144	0.7500	-0.0267	0.0550	-0.4672	0.3276	-0.0481	0.1200	-0.0340	-0.0369	0.1128	0.0018	0.56*
10	2013	0.0252	-0.0072	0.1122	-0.0095	0.0050	0.0066	-0.0594	0.0312	0.0132	0.1100	0.0074	-0.0046	-0.0101	0.22
	2014	0.0003	0.0680	0.0285	-0.0087	0.0004	0.0354	-0.0992	0.0047	0.0006	0.0800	-0.0049	0.0034	0.0015	0.11
	2016	-0.0901	0.0416	0.2550	-0.0294	0.0550	0.2774	-0.1302	0.0039	0.0240	-0.1700	0.0072	-0.1128	0.0084	0.14
11	2013	-0.0048	0.1656	-0.2754	-0.0092	0.0034	0.0087	-0.0801	0.0488	-0.0363	0.0407	0.0200	-0.0088	-0.0126	-0.14
	2014	-0.0006	0.3315	-0.4845	-0.0086	-0.0011	0.0486	-0.1344	0.0060	-0.0096	0.0392	-0.0100	0.0046	-0.0011	-0.22
	2016	0.0119	0.0936	-0.5100	-0.0291	0.0125	0.3066	-0.3276	0.0741	-0.0492	-0.0136	0.0900	-0.1128	0.0036	-0.45*
12	2013	-0.0276	-0.2232	0.3264	-0.0097	0.0080	-0.0084	0.0756	-0.0384	0.0429	-0.0253	-0.0088	0.0200	0.0085	0.14
	2014	-0.0060	-0.2720	0.5225	-0.0092	-0.0033	-0.0522	0.1392	-0.0052	0.0105	-0.0272	0.0046	-0.0100	-0.0117	0.28
	2016	0.0442	-0.1092	0.2850	-0.0285	-0.1400	-0.5329	0.3066	-0.0247	0.0288	0.0408	-0.0216	0.4700	0.0015	0.32

Примечание. № – номер признака; 1 – высота растения; 2 – кустистость; 3 – масса метелки; 4 – масса зерна с боковых стеблей; 5 – длина метелки; 6 – количество колосков в метелке; 7 – количество зерен в метелке; 8 – количество пустых колосков в метелке; 9 – масса зерна с метелки; 10 – масса 1000 зерен; 11 – пустозерность; 12 – плотность метелки; 13 – продуктивность (масса зерна с растения); P₀ – неучтенные (остаточные) факторы (в 2013 г. min = -0.0126, max = 0.0414; в 2014 г. min = -0.0117, max = 0.0027; в 2016 г. min = -0.0057, max = 0.0084).

* Коэффициент корреляции существенен при уровне значимости 5 %.

рен в метелке, массой зерна с метелки, массой 1 000 зерен и плотностью метелки, однако отрицательным – в связях продуктивности с кустистостью, количеством пустых колосков в метелке и пустозерностью. В связях признака «масса всей метелки» с продуктивностью (по горизонтали табл. 3) положительным был косвенный эффект

признаков «масса зерна с метелки» и «количество зерен в метелке», а отрицательным – кустистости, что с учетом большого прямого эффекта массы метелки выразилось в достоверной средней корреляции последней с продуктивностью ($r = 0.49; 0.60; 0.56$). Прямой ($-0.01; -0.01; -0.03$) и косвенные эффекты признака «масса зерна с боковых

побегов» незначимы. А очень тесная положительная корреляция этого признака с продуктивностью (0.99; 0.99; 0.99) была обусловлена во все три года косвенным эффектом кустистости, в 2013 г. — еще и массой 1000 зерен, в 2014 г. — и массой метелки, и количеством зерен с метелки, в 2016 г. — массой метелки, длиной метелки, количеством зерен с метелки, массой зерна с метелки и плотностью метелки. Слабый прямой эффект влияния на продуктивность оказывал признак «масса зерна с метелки» (0.11; 0.03; 0.12), несущественным был также и его косвенный эффект в связях продуктивности с другими признаками. Однако в связях признака «масса зерна с метелки» с продуктивностью положительным был большой косвенный эффект признака «масса всей метелки» при небольшом отрицательном косвенном эффекте кустистости, что в итоге выразилось в среднем положительном достоверном парном коэффициенте корреляции массы зерна с метелки с продуктивностью (0.40; 0.60; 0.56).

Большим был прямой эффект признака «кустистость» (0.72; 0.85; 0.52), положительными оказались также его косвенные эффекты в связях продуктивности с массой зерна с боковых побегов, однако отрицательными — с массой всей метелки, массой зерна с метелки и количеством колосков и зерен в метелке. В связях кустистости с продуктивностью положительные косвенные эффекты других признаков были незначительными, а отрицательный эффект массы всей метелки был небольшим, что в итоге сказалось на средней положительной величине парной корреляции между кустистостью и продуктивностью (0.55; 0.32; 0.34).

По признаку «масса 1000 зерен» прямой эффект был слабым (0.11; 0.08; -0.17), побочный — незначительным, а косвенный эффект большинства других признаков — невысоким положительным, в результате чего коэффициент парной корреляции между массой 1000 зерен и продуктивностью оказался низким (0.22; 0.11; 0.14). Неодинаковый уровень прямого эффекта на продуктивность наблюдался по признаку «плотность метелки»: незначительный в 2013 (0.02) и 2014 гг. (-0.01) при незначительном косвенном эффекте и при невысоком косвенном эффекте большинства других признаков, однако в 2016 г. прямой эффект был положительным (0.47) при незначительном косвенном эффекте признака и положительном косвенном эффекте отдельных других признаков (масса всей метелки, количество зерен в метелке), но отрицательным эффектом большинства других признаков, что выразилось в низких, хотя и положительных парных коэффициентах корреляции плотности метелки с продуктивностью (0.14; 0.28; 0.32).

Признак «высота растений» не имел значительного как прямого (к тому же разнонаправленного по годам — 0.12; 0.03; -0.17), так и косвенного влияния на продуктивность. Оно сказалось через небольшие положительные побочные эффекты ряда других признаков: в 2013 г. — кустистости, массы всей метелки, массы зерна с метелки и массы 1000 зерен, что выразилось в среднем парном коэффициенте корреляции между высотой и продуктивностью (0.31), а в 2014 г. — только массы всей метелки при отсутствии корреляции (-0.03), в 2016 г. — массы всей метелки и длины метелки, однако при значении прямого

коэффициента пути -0.17 корреляция между высотой и продуктивностью практически отсутствовала (0.08).

Пустозерность тоже практически не имела прямого (0.02; -0.01; 0.09) и косвенного влияния на продуктивность, однако в связи с отрицательным косвенным эффектом других признаков (особенно массы всей метелки и количества зерен в метелке) парные коэффициенты корреляции между пустозерностью и продуктивностью были отрицательными, хотя и незначимыми в 2013 и 2014 гг. (-0.14; -0.22; -0.45).

Длина метелки в 2013 и 2014 гг. практически не оказывала значимого как прямого (-0.02; 0.01), так и косвенного эффекта на продуктивность, а положительный косвенный эффект кустистости был компенсирован отрицательным влиянием массы всей метелки и других признаков, в результате чего парные коэффициенты корреляции между длиной метелки и продуктивностью растения оказались практически нулевыми (-0.04; -0.07). В 2016 г., напротив, прямой эффект длины метелки был на уровне 0.25, а косвенный эффект в связях продуктивности с высотой и массой зерна с боковых побегов — положительным. Однако из-за отрицательного косвенного эффекта других признаков (плотность метелки, высота, количество колосков в метелке, масса 1000 зерен) парный коэффициент корреляции между длиной метелки и продуктивностью оказался практически нулевым (-0.01).

Признак «количество зерен в метелке» в 2013 и 2014 гг. не имел большого прямого (0.09; 0.16) и значимого побочного эффектов на продуктивность, и хотя косвенный эффект массы всей метелки был положительным, однако по большинству других признаков в 2013 г. он получен отрицательным, и в результате корреляция между количеством зерен в метелке и продуктивностью в 2013 г. оказалась незначимой (0.07). В 2014 г. отрицательные эффекты были менее значимы, и соответственно увеличился и коэффициент корреляции (0.27). В 2016 г. прямой эффект признака «количество зерен в метелке» составил 0.42 при положительном косвенном эффекте признака в связях продуктивности с массой всей метелки, массой зерна с боковых побегов, количеством колосков в метелке, массой зерна с метелки и плотностью метелки, а также при значительном косвенном эффекте массы всей метелки и плотности метелки, что выразилось в достоверном среднем парном коэффициенте корреляции между признаком «количество зерен в метелке» и продуктивностью растения (0.50).

Как прямой эффект признака «количество колосков в метелке» (-0.01), так и его побочные эффекты в 2013 г. были незначимыми, и хотя косвенный эффект признака «масса всей метелки» был положительным, однако из-за отрицательных косвенных эффектов большинства других признаков корреляция между количеством колосков в метелке и продуктивностью растения практически отсутствовала (0.07). В 2014 г. его значение составило 0.27, так как были положительными косвенные эффекты признаков «масса всей метелки» и «количество зерен в метелке», хотя прямой (-0.06) и косвенный эффекты признака «количество колосков в метелке» были незначимыми. В 2016 г. во влиянии признака «количество зерен в метелке» на продуктивность наблюдалась совсем иная закономерность:

прямой эффект был очень отрицательным, отрицательным был также побочный эффект его в связях продуктивности с массой всей метелки, массой зерна с боковых колосков, длиной метелки, количеством зерен в метелке, массой зерна с метелки и плотностью метелки. Отмечен положительный эффект с кустистостью, количеством пустых колосков в метелке, пустозерностью и массой 1 000 зерен, однако вследствие положительного косвенного эффекта других признаков (масса всей метелки, количество зерен в метелке, плотность метелки) парный коэффициент корреляции между изучаемым признаком и продуктивностью был средним (0.39).

Признаки «количество пустых колосков в метелке» и «пустозерность» практически не имели ни прямого, ни косвенного влияния на продуктивность растения, однако в связи с отрицательным косвенным эффектом ряда других признаков (особенно массы всей метелки и количества зерен в метелке) парный коэффициент корреляции был отрицательным.

Обсуждение

В исследованиях многих авторов показана целесообразность определения взаимосвязей между признаками растений различных культур, в том числе риса, с помощью как парных коэффициентов корреляции, так и путевых коэффициентов. В частности, установлены неодинаковые прямые и косвенные вклады отдельных признаков в их влияние на продуктивность риса (Samonte et al., 1998; Sürek, Beşer, 2003; Ekka et al., 2011).

В наших исследованиях найдены особенности взаимосвязей между различными признаками растений риса по парным коэффициентам корреляции, а также причинно-следственные зависимости в системе взаимосвязанных признаков в результате путевого анализа продуктивности растений. Установлено, что продуктивность растения, масса зерна с метелки и масса зерна с боковых стеблей положительно связаны между собой. Кроме того, положительная взаимосвязь наблюдалась между массой всей метелки, количеством зерен в метелке и плотностью метелки; между массой зерна с метелки, количеством зерен в метелке и количеством колосков в метелке; а также между массой зерна с боковых стеблей, количеством зерен в метелке, количеством колосков в метелке и плотностью метелки. Пустозерность отрицательно влияет на массу всей метелки, количество зерен в метелке, количество колосков в метелке и посредством этих признаков на плотность метелки. На массу 1 000 зерен отрицательно влияют количество зерен и количество колосков в метелке.

В результате путевого анализа продуктивности растений риса решен комплекс задач в системе причинно-следственной взаимосвязи признаков: установлен относительный вклад каждого из 12 признаков на продуктивность, причем как прямой (непосредственный), так и косвенный (побочный) эффекты при взаимодействии с другими признаками. Это дало возможность раскрыть причины взаимозависимостей между признаками и выделить признаки, с помощью которых целесообразно прогнозировать продуктивность растений.

Установлено, что уровень корреляции между показателями продуктивности и другими признаками растений

неодинаково зависит как от прямого и косвенных эффектов влияния отдельного признака на продуктивность в связях продуктивности с другими признаками, так и от косвенных эффектов влияния других признаков в связях продуктивности с изучаемым отдельным признаком.

Уровень прямого эффекта влияния каждого отдельного признака на продуктивность неодинаков и может быть высоким положительным во все годы (масса всей метелки, кустистость) или в отдельный наиболее благоприятный по погодным условиям 2016 г. (плотность метелки, количество зерен в метелке, длина метелки), очень низким в благоприятный год (количество колосков в метелке) или незначимым (по остальным признакам).

Уровни каждого из косвенных (побочных) эффектов влияния каждого отдельного признака в связях продуктивности с другими признаками, а также косвенных эффектов других признаков в связях продуктивности с изученным отдельным признаком могут быть разными, даже противоположного направления, и зависят от погодных условий выращивания растений. К тому же уровень прямого эффекта влияния отдельных признаков на продуктивность растений не всегда одинаково влияет на уровень парных коэффициентов корреляции между ними и продуктивностью, так как в данном случае проявляется зависимость и от соотношения косвенных эффектов влияния других признаков на продуктивность.

Выводы

В результате путевого анализа продуктивности определена наибольшая селекционная ценность отдельных количественных признаков растений риса, которые могут быть детерминантами для отбора и прогноза уровня продуктивности растений:

- масса всей метелки, которая во все три года имела высокие прямой и в некоторой степени косвенный эффекты влияния на продуктивность и для которой получена достоверная положительная парная корреляция с продуктивностью;
- продуктивная кустистость, которая также во все годы имела высокие прямой и косвенный эффекты влияния на продуктивность и положительную парную корреляцию с продуктивностью.

Список литературы / References

- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований), 5-е изд., доп. М.: Агропромиздат, 1985.
- [Dospekhov B.A. Methods of Field Experiment (with the basics of the statistical processing of research results). Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]
- Мухордова М.Е. Взаимосвязь элементов качества с продуктивностью растений у пивоваренного ячменя. Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. 2011;7(81):23-26.
- [Muhordova M.E. The relationship of quality indices with plant productivity in malting barley. Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2011;7(81):23-26. (in Russian)]
- Мухордова М.Е. Корреляционный и путевой анализ признаков продуктивности гибридов озимой пшеницы. Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. 2014;6(116):14-18.
- [Muhordova M.E. Correlation and path analysis of production characters in winter wheat hybrids. Vestnik Altayskogo Gosudarst-

- vennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2014;6(116):14-18. (in Russian)]
- Мухордова М.Е., Калашник Н.А. О корреляционном и путевом анализе элементов продуктивности гибридов F1 яровой мягкой пшеницы. С.-х. биология. 2010;3:54-59.
- [Muhordova M.E., Kalashnik N.A. Correlation and path analyses of performance elements in spring wheat F1 hybrids. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2010;3:54-59. (in Russian)]
- Орлюк А.П., Вожегова Р.А., Шпак Д.В., Шпак Т.М., Цилинко М.І. Ефективність добору за кількісними ознаками на різних етапах селекції рису. Бюлетень Інституту зернового господарства УААН. 2008;33/34:50-52.
- [Orliuk A.P., Vozhegova R.A., Shpak D.V., Shpak T.M., Tsilynko M.I. The efficiency of selection on quantitative traits in various stages of rice breeding. Buletyn Instytutu Zernovogo Gospodarstva = Bulletin of the Institute of Grain Industry, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine. 2008;33/34: 50-52. (in Ukrainian)]
- Орлюк А.П., Шпак Т.М., Шпак Д.В. Кореляційні взаємозв'язки ознаки продуктивності головної волоти у гібридних популяціях рису. Зрошуване землеробство. 2011;55:140-144.
- [Orliuk A.P., Shpak T.M., Shpak D.V. Correlational relationships among performance indices in the main panicle of hybrid rice populations. Zroshuvane Zemlerobstvo = Irrigated Farming. 2011;55: 140-144. (in Ukrainian)]
- Седловский А.И., Мартынов С.П., Мамонов Л.К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. Алма-Ата, 1982.
- [Sedlovskii A.I., Martynov S.P., Mamonov L.K. Methods of Genetical Statistics in Theories of Self-Pollinating Crop Breeding. Alma-Ata, 1982. (in Russian)]
- Сичкарь В.И. Путевой анализ семенной продуктивности у сои. Науч.-техн. бюл. ВСГИ ВАСХНИЛ. 1998;1(67):30-35.
- [Sichkar V.I. Path analysis in soybean seed production. Nauchno-Tekhnicheskii Byulleten VSGI VASHNIL = Scientific and Technical Bulletin of the All-Union Institute of Breeding and Genetics, All-Union Academy of Agricultural Sciences. 1998;1(67):30-35. (in Russian)]
- Шпак Т.М. Кореляційні зв'язки ознак продуктивності та якості зерна у ранньостиглих форм рису. 36. матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених (25 квітня 2013 р.). Херсон: ІЗЗ НААН. 2013;35-37.
- [Shpak T.N. Correlation characteristics of productivity and quality of grain in early-formed rice varieties. Proceeding of the International Scientific Conference of Young Scientists (April 25, 2013). Kherson: Institute of Irrigated Farming, NAAS Ukraine Publ., 2013; 35-37. (in Ukrainian)]
- Akdeniz H., Keskin B., Yilmaz I., Oral E. A research on yield and yield components of some barley cultivars. J. Agric. Sci. 2004;14(2): 119-125.
- Akhtar N., Nazir M.F., Rabnawaz A., Mahmood T., Safdar M.E., Asif M., Rehman A. Estimation of heritability, correlation and path coefficient analysis in fine grain rice (*Oryza sativa* L.) J. Anim. Plant Sci. 2011;21(4):660-664.
- Akinwale M.G., Gregorio G., Nwile F., Akinyele B.O., Ogunbayo S.A., Odiyi A.C. Heritability and correlation coefficient analysis for yield and its components in rice (*Oryza sativa* L.). Afr. J. Plant Sci. 2011;5 (3):207-212.
- Ataei M. Path analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) yield. J. Agric. Sci. (Turkey). 2006;12(3):227-232.
- Aycicek M., Yildirim T. Path coefficient analysis of yield and yield components in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Pak. J. Bot. 2006;38(2):417-424.
- Bagheri N., Babaeian-Jelodar N., Pasha A. Path coefficient analysis for yield and yield components in diverse rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Biharean Biologist. 2011;5:32-35.
- Basavaraja T., Gangaprasad S., Dhushantha Kumar B.M., Hittlmani S.H. Correlation and path analysis of yield and yield attributes in local rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Electron. J. Plant Breed. 2011;2(4):523-526.
- Bhadru D., Reddy D.L., Ramesha M.S. Correlation and path coefficient analysis of yield and yield contributing traits in rice hybrids and their parental lines. Electron. J. Plant Breed. 2011;2(1):112-116.
- Bhutta W.M., Barley T., Ibrahim M. Path-coefficient analysis of some quantitative characters in husked barley. Caderno de Pesquisa. Ser. Biol. 2005;17(1):65-70.
- Ekka R.E., Sarawgi A.K., Kanwar R.R. Correlation and path analysis in traditional rice accessions of Chhattisgarh. J. Rice Res. 2011; 4(1&2):11-18.
- Emine B.C., Necmettin C. Correlation and path coefficient analyses of grain yield and yield components in two-rowed of barley (*Hordeum vulgare* convar. *distichon*) varieties. Not. Sci. Biol. 2012;4(2): 128-131.
- Finne M.A., Rognli O.A., Schjelderup I. Genetic variation in a norwegian germplasm collection of white clover (*Trifolium repens* L.): correlation and path coefficient analyses of agronomic characters, Euphytica. 2000;112:57-68.
- Haider Z., Khan A.S., Zia S. Correlation and path coefficient analysis of yield components in rice (*Oryza sativa* L.) under simulated drought stress condition. Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 2012; 12(1):100-104.
- Hossain S., Maksudul Haque M., Rachman J. Genetic variability, correlation and path coefficient analysis of morphological traits in some extinct local Aman rice (*Oryza sativa* L.). J. Rice Res. 2015;4:2-6.
- Ilker E. Relationships between yield and yield components of barley crosses. J. Agric. Fac. Ege. Univ. 2006;43(3):1-11.
- Khan A.S., Imran M., Ashfaq M. Estimation of genetic variability and correlation for grain yield components in rice. Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 2009;6(5):585-590.
- Mugemangango Cyprien, Vinod Kumar. Correlation and path coefficient analysis of rice cultivars data. Math. Sci. Res. J. 2011;4(2):15-20.
- Ratna M., Begum S., Husna A., Dey S.R., Hossai M.S. Correlation and path coefficients analyses in Basmati rice. Bangladesh J. Agric. Res. 2015;40(1):153-161.
- Samonte S.O., Wilson L.T., McClung M. Path analyses of yield and yield-related traits of fifteen diverse rice genotypes. Crop Sci. 1998; 38:1130-1136.
- Shahid M., Mohammad F., Tahir M. Path coefficient analysis in wheat. Sarhad J. Agric. 2002;18(4):383-388.
- Sinebo W. Yield relationships of barleys grown in a tropical highland environment. Crop Sci. 2002;42:428-437.
- Sürek H., Beşer N. Correlation and path coefficient analysis for some yield-related traits in rice (*Oryza sativa* L.) under Thrace conditions. Turk. J. Agric. For. 2003;27:77-83.
- Türk M., Çelik N., Bayram G., Budakli E. Relationships between seed yield and yield components in carbon bean (*Vicia narbonensis* L.) by path analysis. Bangl. J. Bot. 2008;37(1):27-32.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.03.2018. После доработки 28.02.2019. Принята к публикации 02.03.2019.

Факторы, влияющие на репродуктивную способность инбредных растений свеклы столовой при создании линейного материала для селекции

М.И. Федорова, Е.Г. Козарь, С.А. Ветрова , В.А. Заячковский, В.А. Степанов

Федеральный научный центр овощеводства, пос. ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область, Россия

 e-mail: lana-k2201@rambler.ru

Генеративная система *Beta vulgaris* L. по своему устройству и возможностям относится к высокопроизводительной. При самоопылении репродуктивный потенциал перекрестноопыляемых растений свеклы столовой, имеющих гаметофитный тип самонесовместимости, существенно изменяется и определяется совокупным действием разных факторов, в том числе и уровнем инбредной депрессии. Впервые на культуре свеклы столовой получены оригинальные данные о характере взаимосвязей семенной продуктивности инбредных растений с функциональными параметрами микрогаметофита и степенью самонесовместимости, что имеет важное значение при создании и поддержании константных фертильных линий. Установлено, что в результате инбредной депрессии увеличивается число стерильных микрогамет и пыльцевых зерен с аномальным развитием; снижается фертильность пыльцы и длина пыльцевых трубок; семенная продуктивность в потомствах инбредных растений, в том числе склонных к самоопылению, резко снижается уже после третьего инбридинга. При этом для высокопродуктивных инбредных растений свеклы столовой характерна меньшая скорость роста пыльцевых трубок в условиях *in vitro*. Между уровнем жизнеспособности пыльцы и семенной продуктивностью инбредных растений тесная взаимосвязь отсутствует ввиду того, что элиминация проросших мужских гамет и дегенерация зародышей семян могут происходить на всем протяжении прогамной и последующих фаз оплодотворения. Дегенерирующих зародышей у самонесовместимых форм намного больше, чем у самофертильных, но в результате разрастания околоплодника у семян с недоразвитыми зародышами наблюдается морфологическое сходство со всхожими семенами. Поэтому при оценке инбредных растений свеклы столовой по признаку «самонесовместимость/самофертильность» следует учитывать качественные характеристики семян. Использование метода рекуррентной селекции по признакам «семенная продуктивность», «длина пыльцевых трубок» и «полевая всхожесть» повышает выход форм с потенциально высокой самосовместимостью в потомстве. Для поддержания выделенных в инбредных потомствах ценных генотипов необходимо начиная с третьего инбридинга проводить sibсовы скрещивания, что позволяет снизить негативное влияние инбредной депрессии и самонесовместимости.

Ключевые слова: свекла столовая; инбридинг; инбредная депрессия; семенная продуктивность; самонесовместимость; микрогаметофит; жизнеспособность; пыльцевая трубка.

Для цитирования: Федорова М.И., Козарь Е.Г., Ветрова С.А., Заячковский В.А., Степанов В.А. Факторы, влияющие на репродуктивную способность инбредных растений свеклы столовой при создании линейного материала для селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):439–447. DOI 10.18699/VJ19.512

Factors to affect inbred beet plants while developing material for linear selection

M.I. Fedorova, E.G. Kozar, S.A. Vetrova , V.A. Zayachkovskiy, V.A. Stepanov

Federal Scientific Vegetable Center, VNIISOK, Odintsovo region, Moscow district, Russia

 e-mail: lana-k2201@rambler.ru

Considering its capacities, the generative system of *Beta vulgaris* L. is regarded as highly productive. While inbreeding, the reproductive potential of cross-pollinated beet plants with gametophytic self-incompatibility (SI) changes significantly and is determined by a joint effect of multiple factors including the level of inbred depression. In the present study, original data have been obtained revealing relationships between inbred beet seed productivity, its self-incompatibility and microgametophyte parameters, which is crucial for developing and maintaining constant fertile beet lines. It has been discovered that inbred depression increases the number of sterile microgametes and anomalous pollen grains, reduces pollen fertility and the length of pollen tubes. As a result, the seed yield in inbred beet progeny, including SI ones, reduces significantly just after the third inbreeding. At the same time, highly productive inbred beet is characterized by a lower rate of pollen tube growth *in vitro*. In inbred plants, there is no close relationship between pollen viability and seed productivity, because the elimination of germinated male gametes and degeneration of seed embryos may go over the entire period of fertilization starting its progamic phase. The SI plants have more degenerating embryos than self-fertile ones, but seed vessel outgrowth in the seeds with

abortive embryos makes them morphologically similar to fertile seeds. For that reason, when assessing inbred beet plants based on their self-incompatibility/self-fertility, one should consider the qualitative characteristics of the seeds. Using the method of recurrent selection based on such factors as seed productivity, pollen tube length and field germination rate increase the output of plant forms with a potentially high self-compatibility in their progeny. To support such genotypes in the progeny, one has to, starting from the third inbreeding, perform sib crossing to reduce the negative effect of inbred depression and self-incompatibility.

Key words: beetroot; inbreeding; inbreeding depression; seed productivity; incompatibility; microgametophyte; pollen germination; pollen tubes.

For citation: Fedorova M.I., Kozar E.G., Vetrova S.A., Zayachkovskiy V.A., Stepanov V.A. Factors to affect inbred beet plants while developing material for linear selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):439-447. DOI 10.18699/VJ19.512 (in Russian)

Введение

Среди корнеплодных овощных растений свекла столовая (*Beta vulgaris* L.) занимает одно из ведущих мест и выращивается повсеместно. Наличие в корнеплодах этой культуры бетанина и бетаина – азотсодержащих гетероциклических пигментов, относящихся к классу бетацианинов, делает ее уникальной и незаменимой для рационального питания человека (Красочкин, 1971; Pialetti, 1976; Mabry, 1980; Escribano et al., 1998; Tesoriere et al., 2004; Лапин и др., 2007; Слепцов и др., 2015).

Генеративная система свеклы столовой наиболее высокопроизводящая среди овощных корнеплодных растений по своему устройству и возможностям переопыления. Свекла – выраженный перекрестник с гаметофитной системой самонесовместимости (Owen, 1942; Малецкий и др., 1970). Помимо опыления пылью других растений (ксеногамия), у свеклы наблюдается опыление пылью других цветков в пределах одного растения (гейтеногамия) и пылью своего цветка (автогамия) (Жужжалова и др., 2007).

В настоящее время для потребителя предлагается широкий ассортимент сортов свеклы столовой российской и иностранной селекции, однако производители предпочитают гибриды F_1 , которые по сравнению с сортами более выровнены, пластичны и, как следствие, технологичны. Их возделывание по максимуму исключает ручной труд, в связи с чем снижаются затраты времени и средств (Буренин, Пивоваров, 1998; Федорова, Буренин, 2010). Наибольший эффект гетерозиса достигается при максимальной гибридности потомства, для чего результативно использование различных генетических систем размножения растений, в частности цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), которая потенциально присутствует в каждой перекрестноопыляемой популяции (Малецкий, 2010).

Селекция на гетерозис включает ряд последовательных этапов: изучение разнообразного исходного материала, предпочтительно среди раздельноплодных образцов (одноблестковых и односемянных), получение инбредных потомств, отбор селекционно-ценных биотипов, создание на их основе фертильных (mf) и стерильных (ms) линий с высокой комбинационной способностью, получение гибридов F_1 с комплексом хозяйственно значимых признаков. При работе со сложными гетерогенными популяциями перекрестноопыляющихся культур для получения гомозиготных линий используют инбридинг как один из важных факторов формообразовательного процесса, способствующий выявлению ценных биотипов, имеющих

рецессивные аллели. Самоопыление позволяет разложить гетерогенные популяции на ряд гомозиготных по целевым генам линий, которые наряду с депрессией обладают ценными качествами (Вавилов, 1935).

Уже на первых этапах создания гибридов на основе ЦМС селекционер сталкивается с проблемами не только генетического, селекционного, но и семеноводческого характера. В отличие от сортовых популяций перекрестноопыляемых культур, генетическая стабильность которых обеспечивается за счет переопыления внутри замкнутой популяции, необходимым условием получения и поддержания любой линии является ее способность к самоопылению (Балков, 1978; Федорова, Степанов, 2005; Жужжалова, 2010; Буренин, 2015).

Семенная продуктивность инбредных потомств свеклы характеризуется высокой вариабельностью, как следствие совокупности действия разных генов, в том числе генов самонесовместимости, а также инбредной депрессии. Самонесовместимость (self-incompatibility – SI) при самоопылении возникает в случае совпадения S-генов в пыльце и пестике. В зависимости от времени действия генов и локализации продуктов их жизнедеятельности различают два типа гомоморфной самонесовместимости в группе эвдикотов: спорофитную (sporophytic self-incompatibility – SSI) и гаметофитную (gametophytic self-incompatibility – GSI). Однако у некоторых видов возможно сочетание отдельных признаков данных систем (Жужжалова и др., 2007).

В системе SSI ингибитор роста (белковый комплекс) активируется непосредственно на рыльце при совпадении мономеров собственной пыльцы и пестика, что вызывает реакцию торможения прорастания пыльцевых зерен (Lewis, Crowe, 1958; Knox, Heslop-Harrison, 1970; Foote et al., 1994; Chantha et al., 2013). Система GSI, по последним данным, у ряда видов основана на специфическом распознавании рибонуклеаз (S-RNase) диплоидных тканей пестика, которые расщепляют запасы рРНК собственной пыльцы (рост пыльцевых трубок прекращается) и S-связанных F-box белков мужского гаплоида, способных инактивировать подмножество аллелей S-RNase, за исключением их аллельного «родственника» (Entani et al., 2003; Yamane et al., 2003; Kubo et al., 2010; Ramanauskas, Igić, 2017; Chen et al., 2018). Система SI свеклы, имея гаметофитный тип несовместимости, контролируется четырьмя S-локусами, но пока еще не изучена на молекулярном уровне (Lundqvist et al., 1973; Жужжалова, 2010).

В популяциях свеклы сахарной наряду с самонесовместимыми (автостерильными) растениями, доля кото-

рых может достигать 50 % и более, присутствуют и самосовместимые (самофертильные или автофертильные), пыльцевые зерна которых при самоопылении прорастают в массовом количестве (Magassy, 1965; Корнеева, Голиченко, 1989; Логвинов и др., 1993; Darmency et al., 2009). Растения, завязавшие до 50 шт. семян, относят к самостерильным или самонесовместимым (СН), от 50 до 100 шт. – определяют как склонные к самофертильности (ССФ), от 100 семян и выше – самосовместимые или самофертильные (СФ) (Балков, 1978).

Показано, что признак совместимости и доля СФ растений в инбредных потомствах свеклы сахарной могут закрепляться; их семенная продуктивность в ряду поколений может увеличиваться, хотя это отмечается не во всех случаях (Коновалов, Малецкий, 1990; Жужжалова, 2010; Ошевнев, Грибанова, 2010). Последовательное самоопыление снижает фертильность пыльцевых зерен инбредных потомств, которая в свою очередь зависит от генотипа инбредных растений (Малецкий, 1995; Заячковский и др., 1999; Корнеева, Власюк, 2003; Darmency et al., 2009). При этом фертильность пыльцы самосовместимых растений при одно-трехкратном инбридинге снижается значительно медленнее, чем в инбредных потомствах самонесовместимых растений, у которых в процессе гаметогенеза резко возрастает число аномалий при развитии пыльцевых зерен, ведущих к стерилизации микрогаметофита.

Дальнейшее инбредное размножение приводит к снижению фертильности пыльцы у самофертильных форм, которая при глубоком инбридинге (до I_{10}) может уменьшиться до 20 % от исходного значения (Коновалов, Малецкий, 1990; Федорова, Степанов, 2005). В результате у СФ-форм, как и в случае СН-форм, могут быть потеряны ценные генотипы. Особенно часто это происходит в процессе создания фертильных линий «В» – закрепителей ЦМС (Лялько и др., 1997; Жужжалова, 2010). Поэтому при работе с инбредными потомствами свеклы столовой перво-степенной задачей является поиск *mf*-форм, склонных не только к самоопылению, но и к преодолению инбредной депрессии, при этом важно не упустить депрессионный порог семенной продуктивности.

Цель настоящей работы – изучение взаимосвязей между семенной продуктивностью и функциональными параметрами мужского гаметофита растений свеклы столовой при инбридинге для создания константных линий, их под-держания и размножения.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФНЦО, пос. ВНИИССОК) с 2007 по 2017 г. на семенных растениях различных инбредных потомств свеклы столовой, полученных на основе сортовой популяции Нежность. Сорт получен свободным переопылением гибридов иностранного происхождения с цилиндрической формой корнеплода, путем последующего индивидуального отбора, инбридинга и сестринских скрещиваний. Уже в первом поколении инбридинга этой сортопопуляции присутствовали полностью фертильные и частично стерильные растения с разной степенью выраженности признака ЦМС (различное соотношение стерильных и фертильных пыльников в пределах цветка,

соцветия и ветвей). Фенотипически ЦМС у растений свеклы столовой проявляется в виде маркерной окраски *ms*-пыльников с широким спектром типов окрашивания отдельных частей в различные оттенки бордового – от розового до коричневого (Федорова и др., 2011).

Растения выращивали в условиях защищенного грунта: в необогреваемых ангарной или блочной теплицах в весенне-летнем обороте при естественном освещении с использованием однолетнего (штеклинги) и двулетнего циклов развития. Принудительное самоопыление семенных растений и сибсовое скрещивание проводили под изоляторами двух типов: пергаментными – при изоляции отдельных ветвей на растении, и бязевыми – при изоляции индивидуальных растений и групп. С целью преодоления инбредной депрессии, начиная с третьего инбридинга использовали сибсовые (сестринские) групповые скрещивания (не менее трех растений в группе под общим изолятором).

Биометрические и функциональные параметры микрогаметофита фертильных и частично стерильных инбредных растений изучали *in vitro*, согласно разработанной в ФНЦО методике (Козарь и др., 2017). Объем выборки для подсчетов и измерений в одной повторности составлял 300–500 пыльцевых зерен в трехкратной повторности. Микрофотосъемку проводили на микроскопе Micros с использованием цифровой камеры DCM 300 и при помощи фотосистемы Canon A560 при увеличении микроскопа $\times 10 \times 10$ и $\times 20 \times 10$. Подсчет пыльцевых зерен разных фракций и измерение их параметров осуществляли с помощью программы Score Photo. Жизнеспособность (ЖСП) микрогаметофитной популяции оценивали как процентное содержание проросших пыльцевых зерен (ПЗ) от общего их числа в анализируемой пробе. Полиморфизм, выраженный в процентах, оценивали по соотношению фракций пыльцевых зерен: фертильных, проросших (ЖСП), аномальных и стерильных.

Репродуктивную способность и самосовместимость инбредных растений оценивали по семенной продуктивности ($ПР_{\text{сем}}$) и полевой всхожести семян. К самонесовместимым относили генотипы с семенной продуктивностью от 0 до 1 г, независимо от всхожести, и растения с более высокой продуктивностью, но полевой всхожестью менее 20 %; в группу склонных к самофертильности – с семенной продуктивностью от > 1 до 4 г с растения; к высокопродуктивным самофертильным – с семенной продуктивностью > 4 г при всхожести > 20 %.

Экспресс-оценку качества семян выполняли методом микрофокусной рентгенографии на установках ПРДУ-02 и РМ-1. Анализ внутренней структуры семян проводили согласно «Методике рентгенографии в земледелии и растениеводстве» (Архипов и др., 2001) и «Рентгенографическому анализу качества семян овощных культур» (Му-саев и др., 2012). Для математической обработки результатов использовали методы статистического анализа пакета Microsoft Excel.

Результаты исследований

Сравнительный анализ $ПР_{\text{сем}}$ показал, что инбредные потомства (I_1 – I_3) состоят как из низкопродуктивных растений, так и из растений, завязавших достаточное коли-

Таблица 1. Семенная продуктивность и фертильность пыльцы растений в структуре разных инбредных потомств образца 274 свеклы столовой

Инбридинг	Средняя семенная продуктивность, г/растение	Кол-во растений (%) с семенной продуктивностью			Средняя фертильность пыльцы, %	Доля растений (%) с уровнем фертильности пыльцы		
		0 г	0.1–4.0 г	> 4 г		< 70 %	70–90 %	> 90 %
I ₁	14.5	7	33	60	92	1	26	73
I ₂	13.4	8	42	50	84	3	33	64
I ₃	9.3	14	55	31	80	10	61	29
I ₄	2.5	16	64	20	82	8	44	48
I ₅	6.1	21	49	30	76	20	35	45
HCP ₀₅	4.2				4			

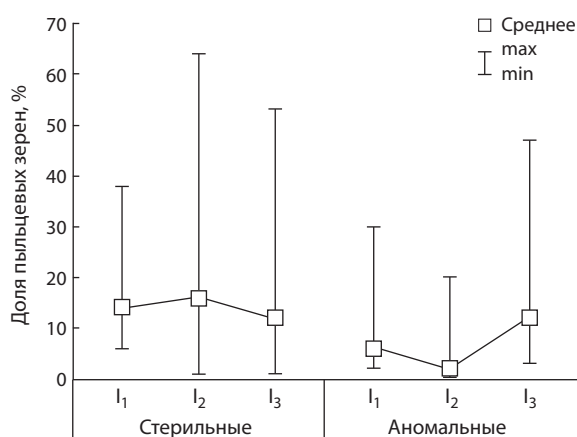
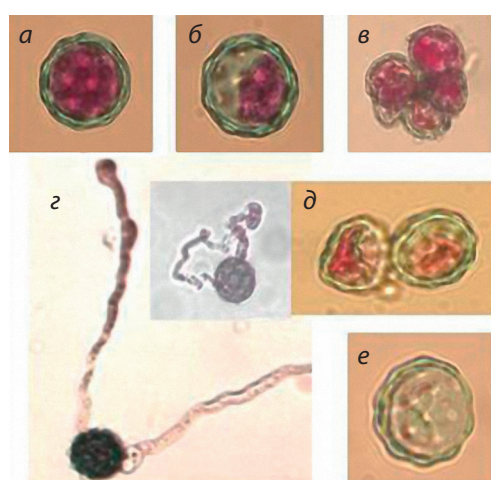


Рис. 1. Стерильные и аномальные микрогаметы у растений разных инбредных потомств свеклы столовой. Пыльцевые зерна: а – фертильное; б–д – аномальные; е – стерильное.

чество семян, и их соотношение в пределах инбредного потомства и каждого образца существенно различается. Доля СН растений инбредных популяций в каждом последующем поколении инбридинга постепенно увеличивалась, в среднем в три раза. В результате доля растений, способных к самоопылению, в потомствах третьего инбридинга составляла 33 %, тогда как среди растений первого инбридинга она достигала 90 %, в том числе 56 % с семенной продуктивностью более 5 г. По средним показателям семенная продуктивность инбредных растений разных поколений оставалась примерно на одном уровне и составляла: в I₁ – 11.2 г/растение; I₂ – 11.9; I₃ – 10.4 г/растение (Приложение 1)¹.

Влияние последовательного самоопыления на изменчивость параметров микрогаметофита и анализ характера их взаимосвязи с репродуктивной способностью инбредных растений свеклы столовой изучали на примере селекционного образца 274, популяция которого характеризовалась самым низким числом СН генотипов (7 %). В этой связи для последующего инбридинга отбирали растения, преимущественно склонные к самофертильности, которые, как правило, находились во всех инбредных

потомствах. В структуре их инбредных потомств присутствовали полностью СН генотипы (ПР_{сем} = 0 г), доля которых постепенно возрастала с глубиной инбридинга (I₁ → I₅) и в пятом поколении достигла 21 % (табл. 1).

Семенная продуктивность растений, способных к самоопылению, оставалась высокой до третьего инбридинга и резко снижалась при дальнейшем инбридинге, в том числе у СФ растений, доля которых составляла всего 20–30 %. Это можно объяснить влиянием возрастающей инбредной депрессии на развитие репродуктивных органов. В результате фертильность пыльцы снижалась за счет увеличения числа стерильных микрогамет, а также пыльцевых зерен с аномальным развитием (деформация, отслоение внутреннего содержимого от оболочки, прорастание нескольких пыльцевых трубок и пр.). Число таких растений в потомстве пятого инбридинга увеличилось в два раза (табл. 1, рис. 1).

Инбредная депрессия отразилась также на функциональных характеристиках пыльцы, главным образом на росте пыльцевых трубок в условиях *in vitro*. Средняя длина пыльцевых трубок растений четвертого-пятого инбридинга через три часа прорастания оказалась почти вдвое меньше таковой у растений третьего инбридинга. При этом, начиная со второго инбридинга, наблюдалось

¹ Приложения 1–3 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx8.pdf>

Таблица 2. Изменчивость и структура инбредных потомств свеклы столовой по признакам «жизнеспособность» и «длина пыльцевой трубки» фертильной пыльцы семенных растений

Поклоение инбридинга	Жизнеспособность, %		Кол-во растений (%) с уровнем ЖСП			Длина пыльцевой трубки, отн. ед.		Кол-во растений (%) с $L_{пт}$ (отн. ед.)		
	средняя	min-max	< 10	10–30	> 30	средняя	min-max	< 200	200–300	> 300
I_3	20	1–44	23	48	29	446	78–790	19	14	67
I_4	17	0–52	44	32	24	263	94–540	24	44	32
I_5	25	0–55	20	20	60	257	110–430	28	30	42
HCP_{05}	9					84				

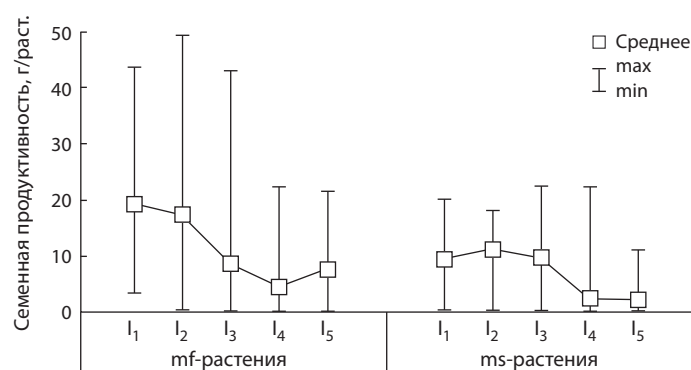


Рис. 2. Изменчивость семенной продуктивности фертильных (а) и частично стерильных (б, в – отдельные ms-пыльники в цветке; г, д – ms-цветки и ветви на растении) растений в структуре разных инбредных потомств свеклы столовой.

постепенное сужение диапазона изменчивости данного признака и увеличение доли растений с низкой скоростью роста пыльцевых трубок ($L_{пт} < 200$ отн. ед.) в потомствах последовательных инбридингов (табл. 2).

Менее значимые различия между растениями разной глубины инбридинга проявились по показателю ЖСП фертильной пыльцы, значения которого находились в широких пределах (0–55 %). Тем не менее определенной закономерности в изменении структуры популяций по соотношению генотипов с разным уровнем ЖСП не прослеживалось. Так, среди растений потомств третьего инбридинга преобладали генотипы со средним уровнем прорастания пыльцы (ЖСП = 10–30 %), среди потомств четвертого – с низким (ЖСП < 10 %), а большинство растений пятого инбридинга обладали способностью пыльцы прорасти в условиях *in vitro* (ЖСП > 30 %). Возможно, это связано с фенотипической изменчивостью, которая в значительной степени определяется влиянием агроклиматических условий выращивания на одновременность созревания и зрелость пыльцы. То есть полученные данные свидетельствуют о том, что инбредная депрессия развития микрогаметофита, наряду с явлением самонесовместимости, влияет на репродуктивную способность инбредных растений.

Взаимосвязь семенной продуктивности и параметров микрогаметофита растений разного уровня инбридинга свеклы столовой. Анализ структуры отдельных групп инбредных mf-растений с разным уровнем $PR_{сем}$ показал определенную взаимосвязь между параметрами микрогаметофита и семенной продуктивно-

стью до третьего инбридинга. Так, в потомстве третьего инбридинга растения с низкой фертильностью (< 70 %) и жизнеспособностью (< 10 %) пыльцы находились только в низкопродуктивной группе ($PR_{сем} < 1$ г). В потомстве четвертого инбридинга такие генотипы появились уже в группе со средним уровнем $PR_{сем}$ (1–4 г), а при пятом инбридинге – и в группе высокопродуктивных растений ($PR_{сем} > 4$ г). При этом доля инбредных растений с низкой ЖСП пыльцы во всех группах почти выравнилась и составила 20–30 % от числа растений каждой группы. Инбредная депрессия роста пыльцевых трубок отдельных растений проявлялась раньше, уже при втором инбридинге, и в потомстве третьего инбридинга доля таких генотипов в группах с низкой и средней $PR_{сем}$ составляла 25 и 20 % соответственно (Прил. 2).

Для отбора представляют интерес растения всех инбредных потомств группы высокопродуктивных, с высокой фертильностью и уровнем ЖСП пыльцы более 30 %. Доля растений с высокой скоростью роста пыльцевых трубок ($L_{пт} > 300$ мкм/ч) в этой группе снижалась с увеличением инбридинга и в потомстве пятого инбридинга составила всего 20 %, тогда как в группе низкопродуктивных растений – около 60 % (см. Прил. 2).

Снижение семенной продуктивности растений, склонных к самоопылению, и пределы ее варьирования в группах mf- и частично стерильных ms-растений инбредных потомств имеют схожую динамику (рис. 2). В то же время отмечены различия: в среднем семенная продуктивность ms-растений при самоопылении значительно ниже, чем полностью фертильных, диапазон изменчивости кото-

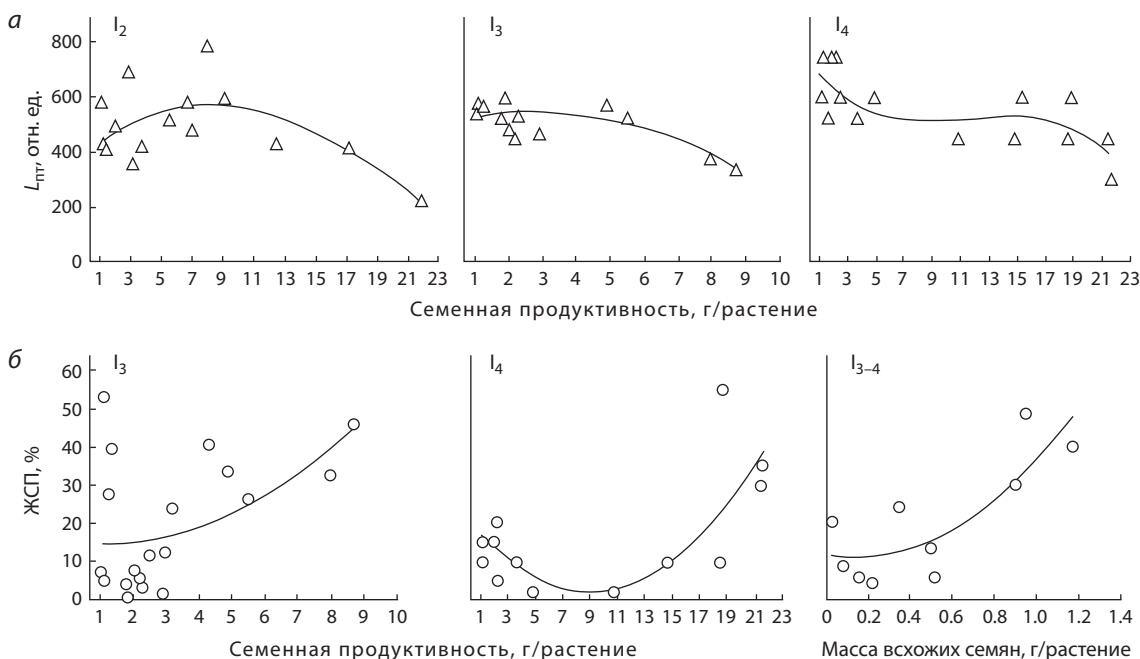


Рис. 3. Взаимосвязь семенной продуктивности с длиной пыльцевой трубки (а) и жизнеспособностью пыльцевых зерен (б) инбредных mf-растений свеклы столовой, склонных к самофертильности.

рых в первых трех инбредных потомствах почти вдвое выше. Резкое снижение семенной продуктивности отмечалось в группе mf-растений третьего инбридинга, а среди ms-растений – при четвертом, где преобладали СН формы. Поэтому отмеченный рост числа СН растений в поколениях четвертого-пятого инбридингов (см. табл. 1) преимущественно связан с наличием в потомствах частично стерильных растений, которые следует браковать, начиная с третьего инбридинга. Особенно это важно при создании mf-линии – закрепителя ЦМС.

Как показали исследования, репродуктивный потенциал инбредных растений при многократном самоопылении в большей степени определяется уровнем их самосовместимости, поскольку в инбредных растениях с различным проявлением ЦМС и сочетанием функциональных параметров пыльцы отмечалась как низкая, так и высокая семенная продуктивность. Дальнейший анализ подтвердил отсутствие стабильных корреляционных связей между признаками микрогаметофита и семенной продуктивностью индивидуальных растений каждого инбредного потомства, однако в пределах группы mf-растений, склонных к самофертильности, во всех потомствах прослеживалась определенная тенденция – скорость роста пыльцевых трубок продуктивных генотипов в условиях *in vitro* ниже (рис. 3, а). Такая взаимосвязь наблюдалась и в отдельных инбредных семьях, особенно в тех, где семенная продуктивность широко варьировала. Например, в инбредных семьях № 274-2 и 274-4 коэффициент корреляции (r) между длиной пыльцевой трубки и семенной продуктивностью растений третьего инбридинга составил -0.64 , в других случаях коэффициенты корреляции изменялись от -0.19 до -0.59 .

Взаимосвязь между уровнем ЖСП пыльцы и семенной продуктивностью инбредных растений неоднозначна.

Положительная корреляция между этими параметрами ($r = 0.40 \dots 0.49$) прослеживается только в поколениях высокой степени инбридинга I_{3-5} mf-растений, склонных к самофертильности. При этом лишь в ряде этих потомств уровень ЖСП пыльцы влиял на количество всхожих семян ($r = 0.53 \dots 0.56$), с нормально развитыми зародышами, способными развиваться во взрослое растение, формирующее корнеплод (см. рис. 3, б). То есть итог оплодотворения при сопоставимом уровне ЖСП пыльцы инбредных растений с разной выраженностью признака самонесовместимости может быть различным.

Это связано с тем, что элиминация мужских гамет происходит на всем протяжении прогамной фазы оплодотворения. При этом чем более несовместимым является растение, тем раньше наблюдаются нарушения прогамной фазы и тем сильнее они выражены. Отсутствие оплодотворения – основная причина гибели зародыша. Однако развитие зародыша даже без оплодотворения может продолжаться вплоть до стадии шара, но поскольку центральная клетка не функционирует и не образует эндосперм, зародыш погибает. Изучение дальнейших этапов эмбриогенеза в ходе формирования семени показало, что дегенерация зародышей и семян при самоопылении растений свеклы наблюдается на разных стадиях развития, при этом количество дегенерирующих зародышей у самостерильных форм намного больше, чем у самофертильных. Следует отметить, что у семян с недоразвитыми зародышами в результате разрастания околоплодника наблюдается внешнее сходство со всхожими семенами (Жужалова и др., 2007).

Более объективным критерием ранжирования растений по признаку «самонесовместимость/фертильность» следует считать массу всхожих семян с растения, которую рассчитывают по формуле $M_{всх} = M_0 \cdot B/100$, где M_0 – об-

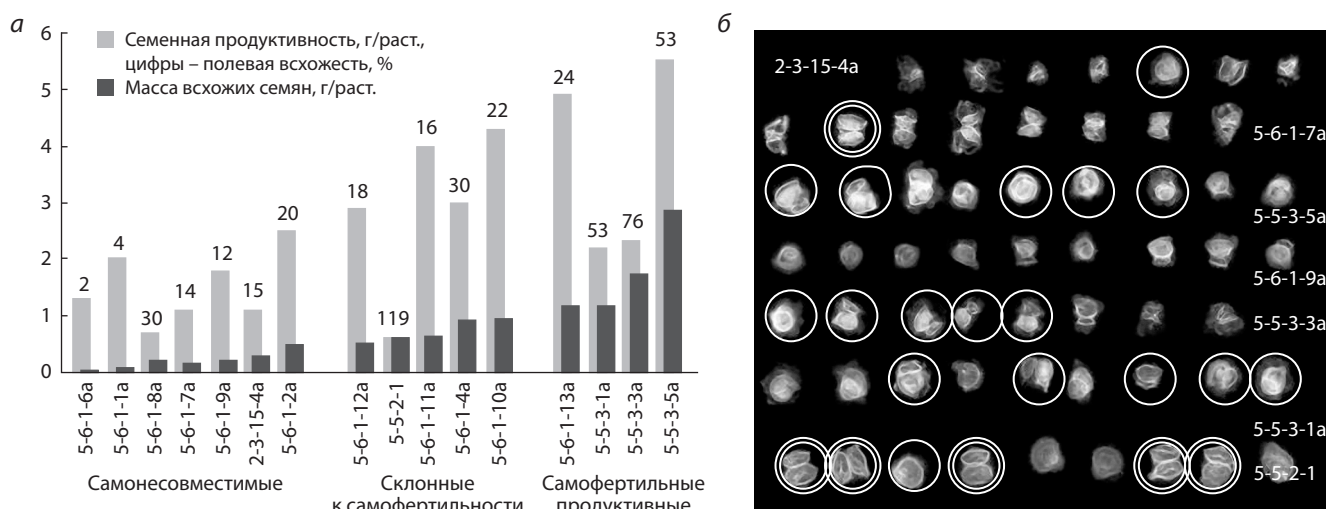


Рис. 4. Распределение инбредных потомств свеклы столовой по показателю «масса всхожих семян» (а) и фрагменты рентгенограмм семян этих потомств (б).

На рентгенограмме окружностями отмечены всхожие односемянные плоды; двойными окружностями – всхожие двусемянные клубочки.

щая масса семян (г), полученных с растения; В – полевая всхожесть, %. К самонесовместимым относят генотипы с $M_{всх} < 0.5$ г/растение; к склонным к самофертильности – $0.5 \leq M_{всх} < 1.0$; к самофертильным – с продуктивностью всхожих семян $M_{всх} \geq 1.0$ г/растение (рис. 4, а). На графике видно, что как среди самонесовместимых, так и среди самофертильных генотипов присутствуют растения, общая семенная продуктивность которых сопоставима, однако полевая всхожесть и, соответственно, масса всхожих семян самофертильных растений с низкой продуктивностью выше, чем самонесовместимых.

Для предварительной оценки степени выраженности самонесовместимости того или иного инбредного потомства свеклы столовой можно использовать метод микрофокусной рентгенографии, который дает возможность определять наличие развитого зародыша в каждом семени еще до прорастивания (Мусаев и др., 2017а, б). Как видно на рентгенограмме (см. рис. 4, б), большинство семян инбредных потомств 274/5-6-1-9а и 274/2-3-15-4а имели полное затемнение внутренней области или только зачатки нежизнеспособного зародыша (светлая зона). При посеве такие семена не давали всходов.

Данные потомства, с учетом семенной продуктивности и полевой всхожести, отнесены к самонесовместимым (см. рис. 4, а). Семенные потомства 274/5-5-3-3а и 274/5-5-3-1а отнесены к самофертильным, поскольку при невысокой общей семенной продуктивности (около 2 г) они характеризовались высокой полевой всхожестью (76 и 53 % соответственно), о чем свидетельствуют и результаты рентгенограммы. Кроме того, по рентгенографическим снимкам можно охарактеризовать индивидуальные растения и потомства по таким признакам, как многоплодность и раздельноплодность, что важно при отборе форм для селекции (см. рис. 4, б).

Использование сибсовых скрещиваний для поддержания ценных инбредных линий. Сибсовые (сестринские) скрещивания в пределах отдельных потомств mf-форм способствуют снижению влияния инбредной

депрессии на функциональные параметры микрогаметофита. Так, жизнеспособность пыльцы растений потомств исходной инбредной формы 274-5-6-1 увеличилась на 4–32 % в зависимости от потомства (за исключением 274-5-6-1-11а). У большинства образцов увеличилась также скорость роста пыльцевой трубки, длина которой в 1.2–2 раза превысила таковую инбредных растений. Исключение составили только два потомства 274-5-6-1-11а и 274-5-6-1-12а, у которых изменение этого показателя было в пределах ошибки опыта (Прил. 3).

Между показателями «ЖСП пыльцы» и «длина пыльцевых трубок» растений инбредных и сибсовых потомств отмечена тесная взаимосвязь ($r = 0.88$ и $r = 0.64$ соответственно), в отличие от семенной продуктивности, поскольку ее повышение при получении сибсов обусловлено не только снижением инбредной депрессии, но и отсутствием негативного влияния самонесовместимости. Тем не менее, как и в инбредных потомствах, отмечается обратная зависимость между длиной трубки и семенной продуктивностью ($r = -0.47$).

При сибсовых скрещиваниях продуктивность растений у большинства потомств достоверно увеличивалась (в 1.4–6.6 раза и более) или оставалась на уровне инбредных растений. Существенно повысилось качество полученных семян, их полевая всхожесть в расчете на посевную единицу (клубочек) в большинстве потомств составила более 40 %. При этом 42 % сибсовых потомств отличались многоплодностью клубочков (полевая всхожесть > 100 %), тогда как среди инбредных потомств доля многоплодных образцов не превышала 10 % от числа изученных. Это надо учитывать при создании фертильных линий, особенно закрепителей стерильности, растения которых должны обладать раздельноплодностью.

Закключение

Сложность получения самофертильных константных линий для селекции свеклы столовой на гетерозис обусловлена гаметофитным контролем признака самонесо-

вместимости и изменчивостью его проявления в растениях инбредных потомств. Репродуктивная способность растений свеклы столовой при самоопылении также зависит от уровня инбредной депрессии, влияющей на функциональные параметры микрогаметофита и развитие зародыша семени.

Использование метода рекуррентной селекции по признакам «семенная продуктивность», «длина пыльцевых трубок» и «полевая всхожесть» повышает выход форм с потенциально высокой самосовместимостью в потомстве. Для воспроизводства и поддержания ценного линейного материала, не позднее третьего инбридинга, следует проводить sibсовы скрещивания, отбирая из перспективных инбредных потомств mf-формы, наиболее склонные к самоферильности.

Список литературы / References

- Архипов М.В., Алексеева Д.И., Батыгин Н.Ф., Великанов Л.П., Гусакова Л.П., Дерунов И.В., Желудков А.Г., Николенко В.Ф., Никитина Л.И., Савин В.Н., Пономаренко Е.Н., Якушев В.П. Методика рентгенографии в земледелии и растениеводстве. М., 2001. [Arkhipov M.V., Alekseeva D.I., Batygin N.F., Velikanov L.P., Gusakova L.P., Derunov I.V., Zheludkov A.G., Nikolenko V.F., Nikitina L.I., Savin V.N., Ponomarenko E.N., Yakushev V.P. X-ray Technique in Agriculture and Crop Production. Moscow, 2001. (in Russian)]
- Балков И.Я. Селекция сахарной свеклы на гетерозис. М., 1978. [Balkov I.J. Sugar Beet Selection for Heterosis. Moscow, 1978. (in Russian)]
- Буренин В.И. Использование инбридинга у свеклы. Сахарная свекла. 2015;1:11-14. [Burenin V.I. The use of inbreeding in beet. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2015;1:11-14. (in Russian)]
- Буренин В.И., Пивоваров В.Ф. Свекла. СПб., 1998. [Burenin V.I., Pivovarov V.F. Beta Vulgaris. St. Petersburg, 1998. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции. Теоретические основы селекции. Т. 1. М.; Л., 1935. [Vavilov N.I. Botanical and Geographical Basis of Breeding. In: Theoretical Bases of Selection. Vol. 1. Moscow; Leningrad, 1935. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П. Влияние инбридинга на формирование генеративных органов сахарной свеклы. Малецкий С.И. (ред.). Энциклопедия рода *Beta*: биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Сова, 2010;164-189. [Zhuzhzhhalova T.P. The effect of inbreeding on the formation of generative organs in sugar beet. In: Maletsky S.I. (Ed.). Encyclopedia of the Genus *Beta*: Biology, Genetics, and Breeding of Sugar Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010;164-189. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Подвигина О.А., Ярмолюк Г.И. Репродуктивная биология сахарной свеклы. Воронеж, 2007. [Zhuzhzhhalova T.P., Znamenskaya V.V., Podvigina O.A., Yarmolyuk G.I. Reproductive Biology of Sugar Beet. Voronezh, 2007. (in Russian)]
- Заячковский В.А., Старцев В.И., Балашова Н.Н. Разработка элементов гетерозисной селекции столовой свеклы. Гавриш. 1999; 3:24-25. [Zayachkovsky V.A., Startsev V.I., Balashova N.N. Development of elements of heterosis-assisted breeding of beetroot. Gavriish. 1999; 3:24-25. (in Russian)]
- Козарь Е.Г., Федорова М.И., Ветрова С.А., Заячковский В.А., Степанов В.А. Оценка функциональных параметров микрогаметофита инбредных растений свеклы столовой. М., 2017. [Kozar E.G., Fedorova M.I., Vetrova S.A., Zayachkovsky V.A., Stepanov V.A. Assessment of Functional Parameters of Microgametophytes of Inbred Beetroot Plants. Moscow, 2017. (in Russian)]
- Коновалов А.А., Малецкий С.И. Расщепление по S-локусам при инбридинге у сахарной свеклы. Генетика. 1990;26(8):1440-1447. [Konovalov A.A., Maletsky S.I. Segregation for S loci during inbreeding in sugar beet. Genetika = Genetics. 1990;26(8):1440-1447. (in Russian)]
- Корнеева М.А., Власюк Н.В. Влияние инбридинга на качество пыльцы опылителей сахарной свеклы разной степени гетерозиготности. Актуальные проблемы генетики. 2003;1:106-107. [Korneeva M.A., Vlasyuk N.V. The effect of inbreeding on the quality of pollen from sugar beet pollinators of varying degrees of heterozygosity. In: Current Issues in Genetics. 2003;1:106-107. (in Russian)]
- Корнеева М.А., Голиченко Т.В. Степень завязываемости семян при самоопылении растений сахарной свеклы в условиях теплиц и поля. Приемы повышения продуктивности сахарной свеклы и семенников. Киев, 1989. [Korneeva M.A., Golichenko T.V. Seed Productivity in Self-Pollination of Sugar Beet Plants in Greenhouses and Fields. Methods of increasing the productivity of sugar beet and seed plants. Kiev, 1989. (in Russian)]
- Красочкин В.Т. Корнеплодные растения. Культурная флора СССР. Т. 19. Л., 1971. [Krasochkin V.T. Root crops. In: Cultural Flora of the USSR. Vol. 19. Leningrad, 1971. (in Russian)]
- Лапин А.А., Быковский Д.В., Давыдов Ю.А., Зеленков В.Н. Свекольный сок – источник антиоксидантов. Картофель и овощи. 2007;6:27. [Lapin A.A., Bykovsky D.V., Davydov U.A., Zelenkov V.N. Beet juice is a source of antioxidants. Kartoffel i Ovoshchi = Potatoes and Vegetables. 2007;6:27. (in Russian)]
- Логвинов В.А., Красильников Е.А., Волгин В.В., Логвинова А.П., Кудрявцева Н.В. Самосовместимость сахарной свеклы в процессе инбридинга. С.-х. биология. 1993;3:22-25. [Logvinov V.A., Krasilnikov E.A., Volgin V.V., Logvinova A.P., Kudryavtseva N.V. Self-compatibility of sugar beet in the process of inbreeding. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 1993;3:22-25. (in Russian)]
- Лялько И.И., Сидоренко А.С., Шевцов И.А. Получение закрепителей стерильности для гетерозисной селекции сахарной свеклы. Вестн. аграр. науки. 1997;10:52-54. [Lyalko I.I., Sidorenko A.S., Shevtsov I.A. Raise of sterility fixers for heterosis selection of sugar beet. Vestnik Agrarnoy Nauki = Bulletin of Agrarian Science. 1997;10:52-54. (in Russian)]
- Малецкий С.И. Варьирование цитоплазматически контролируемой стерильности пыльцы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и ее связь с гетероплазмией митохондрий в клетках. Генетика. 1995;31(11):1461-1467. [Maletsky S.I. Variation of cytoplasmically controlled sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) pollen and its relationship with mitochondrial heteroplasmy in cells. Genetika = Genetics. 1995;31(11):1461-1467. (in Russian)]
- Малецкий С.И. (ред.). Энциклопедия рода *Beta*: биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Сова, 2010;542-554. [Maletsky S.I. (Ed.). Encyclopedia of the Genus *Beta*: Biology, Genetics and Breeding of Sugar Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010; 542-554. (in Russian)]
- Малецкий С.И., Денисова Э.В., Лутков А.Н. Получение самоопыленных линий у самонесовместимых растений сахарной свеклы. Генетика. 1970;6(6):180. [Maletsky S.I., Denisova E.V., Lutkov A.N. Raise of self-pollinated lines from self-incompatible sugar beet plants. Genetika = Genetics. 1970;6(6):180. (in Russian)]
- Мусаев Ф.Б., Архипов М.В., Прияткин Н.С., Староверов И.Е., Потрахов Н.Н. Метод микрофокусной рентгенографии для анализа качества семян овощных культур. Сб. статей междунар. науч. конф. «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям бу-

- дущего», посвящ. 85-летию Агрофизического НИИ. М., 2017а; 332-336.
- [Musaev F.B., Arkhipov M.V., Priyatkin N.S., Staroverov I.E., Potrakhov N.N. The microfocal radiography method for analyzing the quality of vegetable seeds. In: Trends in the Development of Agrophysics: from Topical Issues of Agriculture and Crop Production to Future Technologies: Proceedings of the Int. Sci. Conf. dedicated to the 85th anniversary of the Agrophysical Research Institute. Moscow, 2017a;332-336. (in Russian)]
- Мусаев Ф.Б., Бухаров А.Ф., Козарь Е.Г., Белецкий С.Л. Современный инструментальный метод контроля качества семян. Овощи России. 2017б;4(37):73-77. DOI 10.18619/2072-9146-2017-4-73-77.
- [Musayev F.B., Bukharov A.F., Kozar E.G., Beletsky S.L. A modern instrumental method of seed quality control. Ovoshchi Rossii = Vegetable crops of Russia. 2017b;4(37):73-77. DOI 10.18619/2072-9146-2017-4-73-77. (in Russian)]
- Мусаев Ф.Б., Прозорова О.А., Архипов М.В., Великанов Л.П., Потрахов Е.Н., Бессонов В.Б. Рентгенографический анализ качества семян овощных культур. Овощи России. 2012;4(17):43-47.
- [Musaev F.B., Prozorova O.A., Arkhipov M.V., Velikanov L.P., Potrakhov E.N., Bessonov V.B. X-ray analysis of the quality of vegetable seeds. Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia. 2012;4(17):43-47. (in Russian)]
- Ошевнев В.П., Грибанова Н.П. Селекция самосовместимых опылителей О-типа у сахарной свеклы. Малецкий С.И. (ред.). Энциклопедия рода *Beta*: биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Сова, 2010;542-554.
- [Oshevnev V.P., Gribanova N.P. Breeding of self-compatible O-type pollinators in sugar beet. In: Maletsky S.I. (Ed.). Encyclopedia of the Genus *Beta*: Biology, Genetics and Breeding of Sugar Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010;542-554. (in Russian)]
- Слепцов И.В., Воронов И.В., Журавская Е.Р., Поскачина Е.Р. Выделение и идентификация бетацианиновых пигментов из *Beta vulgaris* и *Amaranthus retroflexus*. Химия растит. сырья. 2015;3:111-115. DOI 10.14258/jcprm.201503757.
- [Sleptsov I.V., Voronov I.V., Zhuravskaya E.R., Poskachina E.R. Isolation and identification of betacyanin pigments from *Beta vulgaris* and *Amaranthus retroflexus*. Khimiya Rastitelnogo Syr'ya = Chemistry of Plant Materials. 2015;3:111-115. DOI 10.14258/jcprm.201503757. (in Russian)]
- Федорова М.И., Буренин В.И. Биология, генетика и селекция столовой свеклы. Малецкий С.И. (ред.). Энциклопедия рода *Beta*: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Сова, 2010;588-597.
- [Fedorova M.I., Burenin V.I. Biology, genetics, and breeding of table beet. In: Maletsky S.I. (Ed.). Encyclopedia of the Genus *Beta*: Biology, Genetics and Breeding of Sugar Beet. Novosibirsk: Sova Publ., 2010;588-597. (in Russian)]
- Федорова М.И., Ветрова С.А., Козарь Е.Г. Особенности фенотипического проявления признака ЦМС семенных растений свеклы столовой. Овощи России. 2011;3(12):18-23.
- [Fedorova M.I., Vetrova S.A., Kozar E.G. Features of the phenotypic manifestation of the CMS symptom in beetroot seed plants. Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia. 2011;3(12):18-23. (in Russian)]
- Федорова М.И. Степанов В.А. Основные направления и методы селекции корнеплодных растений. Селекция и семеноводство корнеплодных овощных культур: Сб. науч. тр. М., 2005;13-17.
- [Fedorova M.I., Stepanov V.A. The main directions and methods of breeding of root plants. In: Breeding and Seed Production of Root Vegetable Crops. Moscow, 2005;13-17. (in Russian)]
- Chantha S.C., Herman A.C., Platts A.E., Vekemans X., Schoen D.J. Secondary evolution of a self-incompatibility locus in the Brassicaceae genus *Leavenworthia*. PLoS Biol. 2013;11(5). DOI 10.1371/journal.pbio.1001560.
- Chen Q. Meng D., Gu Z., Li W., Yuan H., Duan X., Yang Q., Li Y., Li T. SLFL genes participate in the ubiquitination and degradation reaction of S-RNase in self-compatible peach. Front. Plant Sci. 2018;9:227. DOI 10.3389/fpls.2018.00227.
- Darmency H., Klein E.K., De Garenbe T.G., Gouyon P.H., Richard-Molard M., Muchembled C. Pollen dispersal in sugar beet production fields. Theor. Appl. Genet. 2009;118(6):1083-1092. DOI 10.1007/s00122-009-0964-y.
- Entani T., Iwano M., Shiba H., Che F.S., Isogai A., Takayama S. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. Genes Cells. 2003;8(3):203-213. DOI 10.1046/j.1365-2443.2003.00626.x.
- Escribano J., Pedreño M.A., García-Carmona F., Muñoz R. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. Phytochem. Anal. 1998;9(3):124-127. DOI 10.1002/(SICI)1099-1565(199805/06)9:3<124::AID-PCA401>3.0.CO;2-0.
- Foot H.C., Ride J.P., Franklin-Tong V.E., Walker E.A., Lawrence M.J., Franklin F.C. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994;91(6):2265-2269. DOI 10.1073/pnas.91.6.2265.
- Knox R.B., Heslop-Harrison J. Pollen wall proteins: localization and enzymatic activity. J. Cell Sci. 1970;6:1-27.
- Kubo K.I., Entani T., Takara A., Wang N., Fields A.M., Hua Z., Toyoda M., Kawashima S.-I., Ando T., Isogai A. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. Science. 2010;330(6005):796-799. DOI 10.1126/science.1195243.
- Lewis D., Crowe L.K. Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. Heredity. 1958;2:233-256. DOI 10.1038/hdy.1958.26.
- Lundqvist A., Osterbye V., Larsen K., Ib Linde Laursen. Complex self-incompatibility systems in *Ranunculus acris* L. and *Beta vulgaris* L. Hereditas. 1973;74:161-168.
- Mabry T.J. Betalains. In: Bell E.A., Charlwood B.V. (Eds.). Encyclopedia of Plant Physiology (Secondary Plant Products). Vol. 8. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1980;513-533.
- Magassy I. Recent experimental results on self-incompatibility and self-compatibility in beet (*Beta vulgaris*). Acta Agron. J. 1965;13(3/4):241-262.
- Owen F.V. Inheritance of cross- and self-sterility and self-fertility in *Beta vulgaris* L. J. Agric. Res. 1942;64:679-698.
- Pialetti M. Betalains. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. New York: Acad. Press, 1976;1:560.
- Ramanauskas K., Igić B. The evolutionary history of plant T2/S-type ribonucleases. Peer J. 2017;5:3790. DOI 10.7717/peerj.3790.
- Tesorieri L., Allegra M., Butera D., Livrea M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. Am. J. Clin. Nutr. 2004;80(4):941-945. DOI 10.1093/ajcn/80.4.941.
- Yamane H., Ikeda K., Ushijima K., Sassa H., Tao R. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. Plant Cell Physiol. 2003;44(7):764-769. DOI 10.1093/pcp/pcg088.

ORCID ID

M.I. Fedorova orcid.org/0000-0002-7533-5185
E.G. Kozar orcid.org/0000-0002-1319-5631
S.A. Vetrova orcid.org/0000-0002-9897-0413
V.A. Zayachkovskiy orcid.org/0000-0001-9821-5381

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.09.2018. После доработки 21.03.2019. Принята к публикации 22.03.2019.

Генетические подходы к изучению функций серотонинергических нейронов у животных

У.С. Дрозд^{1, 2}✉, Е.В. Шабурова^{1, 2}, Н.Н. Дыгало^{1, 2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

✉ e-mail: drozdnsu@gmail.com

Серотонинергическая система, которая принимает участие в регуляции большинства функций ЦНС, является одной из важнейших нейротрансмиттерных систем. Патогенез многих психических и нейродегенеративных заболеваний включает нарушения в функционировании этой системы. Понимание механизмов ее работы поможет не только разработать новые терапевтические подходы к лечению, но и установить, как эта нейротрансмиттерная система взаимодействует с другими отделами мозга, регулируя их деятельность. Ввиду сложности и гетерогенности анатомо-функционального устройства серотонинергической системы, в настоящее время лучшими инструментами для ее изучения являются методы, основанные на манипулировании отдельными типами нейронов и не затрагивающие нейроны других нейротрансмиттерных систем. Такое избирательное управление клетками возможно за счет генетической детерминированности их функций. Белки, обуславливающие уникальность клеточного типа, экспрессируются в нем под регуляцией клеточно-специфичных промоторов. С использованием промоторов, специфичных для генов серотониновой системы, возможно управление экспрессией гена интереса в серотонинергических нейронах. В обзоре рассмотрены подходы с применением таких промоторов. Генетические модели, созданные при помощи описанных подходов, используются для установления роли серотонинергической системы в модулировании поведения и обработке сенсорной информации. В частности, генетические нокауты по серотониновым генам *sert*, *pet1* и *tph2* помогли выяснить вклад этих генов в формирование и функционирование головного мозга. Кроме того, описываются индуцибельные модели, которые позволили управлять экспрессией генов на различных стадиях онтогенеза. И наконец, приведены примеры достижений в применении этих генетических подходов в оптогенетике и хемогенетике, которые предоставили новый ресурс для изучения функций, разрядной активности и сигнальной трансдукции серотонинергических нейронов. При создании моделей патологических состояний и разработке фармакологических средств их коррекции на основе рассмотренных генетических подходов необходимо учитывать, что каждый из них имеет свои достоинства и ограничения, и выбирать наиболее подходящий из них.

Ключевые слова: серотонинергические нейроны; генетические модели; вирусная трансдукция; оптогенетика; хемогенетика.

Для цитирования: Дрозд У.С., Шабурова Е.В., Дыгало Н.Н. Генетические подходы к изучению функций серотонинергических нейронов у животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):448-455. DOI 10.18699/VJ19.513

Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals

U.S. Drozd^{1, 2}✉, E.V. Shaburova^{1, 2}, N.N. Dygalo^{1, 2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: drozdnsu@gmail.com

The serotonergic system is one of the most important neurotransmitter systems that take part in the regulation of vital CNS functions. The understanding of its mechanisms will help scientists create new therapeutic approaches to the treatment of mental and neurodegenerative diseases and find out how this neurotransmitter system interacts with other parts of the brain and regulates their activity. Since the serotonergic system anatomy and functionality are heterogeneous and complex, the best tools for studying them are based on manipulation of individual types of neurons without affecting neurons of other neurotransmitter systems. The selective cell control is possible due to the genetic determinism of their functions. Proteins that determine the uniqueness of the cell type are expressed under the regulation of cell-specific promoters. By using promoters that are specific for genes of the serotonin system, one can control the expression of a gene of interest in serotonergic neurons. Here we review approaches based on such promoters. The genetic models to be discussed in the article have already shed the light on the role of the serotonergic system in modulating behavior and processing sensory information. In particular, genetic knockouts of serotonin genes *sert*, *pet1*, and *tph2* promoted the determination of their contribution to the develop-

ment and functioning of the brain. In addition, the review describes inducible models that allow gene expression to be controlled at various developmental stages. Finally, the application of these genetic approaches in optogenetics and chemogenetics provided a new resource for studying the functions, discharge activity, and signal transduction of serotonergic neurons. Nevertheless, the advantages and limitations of the discussed genetic approaches should be taken into consideration in the course of creating models of pathological conditions and developing pharmacological treatments for their correction.

Key words: serotonergic neurons; genetic models; viral transduction; optogenetics; chemogenetics.

For citation: Drozd U.S., Shaburova E.V., Dygalo N.N. Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4): 448-455. DOI 10.18699/VJ19.513 (in Russian)

Введение

Серотониновая нейротрансмиттерная система головного мозга вовлечена в регуляцию многих физиологических функций, таких как болевая чувствительность, цикл сон/бодрствование (Whitney et al., 2016), пищевого и репродуктивного поведения, когнитивных функций и настроения (Wong-Lin et al., 2017), модулирует функции обонятельной системы (Carlson et al., 2016). Роль серотонина в патогенезе различных психиатрических заболеваний подчеркнута также во множестве клинических и доклинических исследований (Vadodaria et al., 2018).

Синтез серотонина в центральной нервной системе (ЦНС) осуществляют серотонинергические нейроны, находящиеся в ядрах шва ствола мозга, вентро-медиальной части продолговатого мозга и ретикулярном ядре моста (Baker et al., 1991). Проекция этих нейронов широко распространяется по головному и спинному мозгу. Задача изучения их функций усложняется относительно небольшим количеством серотониновых нейронов вместе с рассеянным распределением их аксонов. Кроме того, хотя серотониновые нейроны анатомически кластеризованы, их группы не гомогенны по электрофизиологическим свойствам и обычно состоят из нескольких субпопуляций, которые активно изучаются (Ren et al., 2018). Таким образом, электрофизиологические исследования, проводимые путем внедрения электрода в ядра шва, не дают адекватного понимания функций отдельных клеточных популяций (Calizo et al., 2011). Исследования, которые проводятся при помощи фармакологических подходов, хотя и внесли значимый вклад в понимание серотониновой нейротрансмиссии, тоже имеют свои ограничения: наличие периферических эффектов, невозможность контролировать отдельные типы нейронов и, в некоторых случаях, неясные механизмы действия (Choi et al., 2004). Поэтому в настоящее время внимание исследователей сосредоточено на генетических инструментах, которые позволяют манипулировать отдельными типами нейронов, не затрагивая нейроны других нейротрансмиттерных систем.

Промоторы генов, используемые для экспрессии трансгенов в серотонинергических нейронах

Экспрессия гена интереса в клетках определенного типа обеспечивается тканеспецифичными промоторами. Для экспрессии целевых генов в серотонинергических нейронах используют промоторы генов *tph2*, *pet-1* и *sert* (Hainer et al., 2016). Достоинством гена *tph2*, нейрональной триптофангидроксилазы, ключевого фермента биосинтеза серотонина, является то, что он имеет высокий уровень

экспрессии только в серотонинергических нейронах головного мозга, в отличие от гена *tph1*, почти не экспрессирующегося в ЦНС (за исключением пинеалоцитов эпифиза, в которых серотонин присутствует в качестве промежуточного продукта при синтезе мелатонина) (Patel et al., 2004). В промоторе *tph2* присутствует NRSE – сайленсер, не дающий запустить транскрипцию данного гена не в нейрональных клетках (Patel et al., 2007), а также сайты связывания транскрипционного фактора Pet-1 (Liu et al., 2010), направляющего развитие серотонинергических нейронов в онтогенезе и имеющего важную роль в поддержании серотонинергического фенотипа во взрослых нейронах (Liu et al., 2010; Fernandez et al., 2017). В связи с тем, что Pet-1 сам является маркером серотонинергических нейронов, промотор его гена (точнее, его энхансерная область (Scott et al., 2005)) считается для них тканеспецифичным (Deneris, 2011). Помимо прочих, Pet-1 контролирует экспрессию *sert* (или *slc6a4*) – гена серотонинового транспортера, чей промотор используется для изучения серотонинергических нейронов (Hainer et al., 2016). Однако, в отличие от Pet-1 и Tph2, Sert экспрессируется не только в серотониновых нейронах, но и в астроцитарной глии (Blakely, 2001), и может синтезироваться в нейронах префронтальной коры, таламуса и сетчатки в ходе развития нервной системы (Gaspar et al., 2003).

Кроме вышеуказанных генов, активное участие в функционировании серотонинергического нейрона принимают гены декарбоксилазы ароматических аминокислот (*aadc*, или *ddc*), везикулярного переносчика моноаминов (*slc18a2*, или *vmat2*), моноаминоксидаз А и В (*maoa* и *maob*), 5-HT_{1a/b}-авторецепторов (*htr1a* и *htr1b*), а также гены, кодирующие ферменты для синтеза и восстановления тетрагидробиоптерина (BH₄) (Müller, Jacobs, 2010). Однако эндогенные промоторы этих генов либо слабы, либо недостаточно специфичны, чтобы с их помощью осуществлять направленное управление фенотипом серотониновых нейронов (Deneris, Wyler, 2012).

Трансгенные линии животных для исследования серотонинергической нейротрансмиссии

Использование трансгенных животных – распространенный метод для исследования серотонинергической системы. Эти линии животных применяются для выяснения роли конкретных генов в развитии и функционировании как организма в целом, так и отдельных клеток. Широко применяются генетические модели, такие как нокауты (knock-out), нокины (knock-in), а также животные, полученные с использованием ВАС (bacterial artificial chromosome). ВАС – это ДНК-конструкт, длина которого может

превышать 350 тыс. пар оснований (Shizuya et al., 1992), что позволяет встраивать большие фрагменты ДНК: генов или их промоторных областей (Zhuang et al., 2005). При этом трансгенез проводится путем введения ВАС в про-нуклеус зиготы (Richardson-Jones et al., 2010). Получение генетических нокаутов и нокинов происходит в два этапа. Сначала в эмбриональные стволовые клетки методом гомологичной репарации прицельно вносится вставка (для получения нокаутов вставка вносится вместо выбранного гена), после чего модифицированные клетки вводят в бластоцисту. Взрослых химерных животных скрещивают с животными дикого типа, после чего отбирают их гетерозиготных потомков (Zhuang et al., 2005). Этих потомков также скрещивают между собой, и из получившегося третьего поколения отбирают животных, гомозиготных по наличию вставки (Richardson-Jones et al., 2011).

Для исследования серотонинергической системы на основе вышеприведенных подходов получены разные линии трансгенных животных, большая часть из которых основана на явлении Cre-LoxP рекомбинации (или Flp-FRT рекомбинации). Рекомбиназы Cre и Flp узнают последовательности LoxP и FRT соответственно и катализируют рекомбинацию фланкированного фрагмента ДНК, что приводит либо к его удалению, либо к инверсии. Фланкированный участок ДНК может быть стоп-кассетой перед геном или же самим геном, таким образом, его удаление либо включает, либо выключает экспрессию (Muñoz-Jiménez et al., 2017). На основе этого явления было получено несколько линий трансгенных животных для таргетирования серотониновой системы, где под специфичным промотором (*sert*, *pet-1* или *tph2*) экспрессируется Cre-рекомбиназа (Hainer et al., 2016). При помощи таких животных можно получать модели условных нокаутов (Liu et al., 2010) и условной индукции генов серотониновой системы (Piszczeck et al., 2013), таким образом изучая вклад конкретных генов в ее работу (характеристики и получение этих и других генетических моделей описаны в таблице). К примеру, при помощи такого подхода были получены доказательства необходимости Pet-1 не только для запуска серотониновой программы в нейронах, но и для поддержания серотонинергического фенотипа в дальнейшем (Liu et al., 2010).

Кроме того, при помощи комбинации рекомбиназ Cre и Flp можно изучать отдельные подтипы нейронов серотониновой системы, а также ее развитие в онтогенезе, анализируя потомков разных ромбомеров (Kim et al., 2009). Имеются и другие способы получения трансгенных животных, без использования рекомбиназ. Например, при помощи технологии CRISPR/Cas9 были получены первые трансгенные свиньи, являющиеся генетическими нокаутами по *tph2* (Li et al., 2017).

Несмотря на несомненный вклад описанных выше линий с конститутивным изменением экспрессии генов в исследование серотонинергической системы, их основным минусом является то, что они не позволяют изучать работу этой нейротрансмиттерной системы в чистом виде, поскольку в ходе развития нервной системы в них может возникнуть компенсаторный эффект со стороны других нейротрансмиттерных систем, а также нарушения в работе нейронов в целом (Hainer et al., 2016).

Индукцибельные модели экспрессии

Индукцибельные генетические модели позволяют не только избегать компенсаторных эффектов, но и изучать развитие серотонинергической системы в онтогенезе. Одной из систем для достижения пространственно-временного контроля над экспрессией трансгена является индукцибельная система Cre-ERT2. Рекомбиназа Cre-ERT2 представляет собой химерный белок, состоящий из Cre-рекомбиназы и мутантной формы человеческого рецептора эстрогена, который связывает не эстрадиол, а синтетический лиганд тамоксифен (TMX). При введении TMX химерная рекомбиназа активируется, проходит через ядерную мембрану в ядро и индуцирует рекомбинацию фланкированного участка, что позволяет контролировать экспрессию гена интереса во времени (Kristianto et al., 2017).

Другой способ контроля экспрессии гена интереса, позволяющий обойтись без Cre-рекомбиназ, заключается в использовании таких лиганд-индукцибельных систем, как Tet-ON/Tet-OFF. При введении тетрациклин-подобных соединений тетрациклин-зависимый белок-трансактиватор (rtTA или tTA) меняет свою конформацию и в зависимости от типа системы связывается (Tet-ON) или не связывается (Tet-OFF) с последовательностью tetO, соответственно способствуя или блокируя экспрессию трансгена (Das et al., 2016). Известна также модификация, при которой под контролем специфичного промотора находится ген химерного тетрациклин-зависимого белка-трансактиватора, слитого с доменом KRAB, сильным репрессором; получившийся химерный белок будет сильнее подавлять экспрессию гена интереса, связываясь с операторной последовательностью перед ним (Richardson-Jones et al., 2011). На основе систем Tet-OFF и Tet-ON было получено несколько генетических моделей для изучения серотонинергической системы (Weber et al., 2012; Donaldson et al., 2014; Hilber et al., 2015), к примеру, было показано влияние сниженной экспрессии ауторецепторов 5-HT_{1A} на развитие тревожного поведения (Donaldson et al., 2014). При этом, в отличие от активируемых Cre-рекомбиназ, воздействие тетрациклин-индукцибельной системы обратимо, поскольку ее работа не вносит прямых изменений в последовательность ДНК, что увеличивает количество ее возможных приложений. Минусом данного метода является то, что доксициклин (наиболее часто используемое тетрациклин-подобное соединение), необходимый для обеспечения индукцибельности, сам по себе может влиять на состояние животного (Shishkina et al., 2017). Это может осложнить интерпретацию результатов, получаемых, например, при проведении поведенческих тестов.

Вирусные векторы

Вирусные векторы – еще один многообещающий подход для изучения серотонинергической системы. Вектор стереотаксически доставляется в ядра шва головного мозга во время необходимой стадии развития, поэтому он не влияет на протекание предшествующих стадий. Проводится множество исследований, в которых используют комбинацию вирусных векторов с трансгенными животными, преимущественно с теми, что основаны на Cre/LoxP рекомбинации (Tye, Deisseroth, 2012; Verheij et al., 2018).

Виды генетических моделей, используемые для исследования серотонинергической системы

Генетическая модель	Способ получения	Характеристики	Пример
Трансген (BAC)	Введение генетического конструкта с геном интереса под контролем специфического промотора в пронуклеус животного	Конструкт присутствует во всех клетках организма и на протяжении всей жизни, может передаваться потомству	Zhao et al., 2011
Вирусное таргетирование	Введение генетического конструкта с геном интереса под контролем специфического промотора в животное на любой стадии развития	Конструкт стереотаксически доставляется в изучаемую область, не передается потомству, может обеспечить индуцибельную и обратимую специфичную экспрессию гена интереса	Benzekhroufa et al., 2009
Генетические нокауты	Замещение гена интереса другой последовательностью (стоп-кассетой или другим геном)	Ген отсутствует во всех клетках организма на протяжении всей жизни	Mosienko et al., 2012
Условные нокауты	Скрещивание животного с фланкированным LoxP геном интереса и животного с Cre-рекомбиназой под контролем специфического промотора	Экспрессия гена отсутствует только в Cre-экспрессирующих клетках	Liu et al., 2010
Условная индукция	Скрещивание животного с фланкированной LoxP стоп-кассетой перед геном интереса и животного с Cre-рекомбиназой под контролем специфического промотора	Экспрессия гена наблюдается только в Cre-экспрессирующих клетках	Piszczyk et al., 2013
Индукцибельные нокауты	Скрещивание животного с фланкированным LoxP геном интереса и животного с индуцибельной Cre-ERT2 рекомбиназой под контролем специфического промотора	При введении тамоксифена ген вырезается только в Cre-экспрессирующих клетках; система обеспечивает временно- и пространственно-специфичное необратимое отсутствие экспрессии гена	Liu et al., 2010
Индукцибельный трансген	Скрещивание животного с последовательностью tetO перед геном интереса и животного с тетрациклин-зависимым белком-трансактиваторм (tTA или rtTA) под контролем специфического промотора	При введении тетрациклин-подобных соединений модуляция экспрессии гена происходит только в клетках, экспрессирующих tTA или rtTA; система обеспечивает модулирование временно- и пространственно-специфичной обратимой экспрессии гена	Hilber et al., 2005
Индукцибельная супрессия	Скрещивание животного с последовательностью tetO перед геном интереса и животного с тетрациклин-зависимым белком-трансактиваторм (tTA или rtTA), слитым с супрессором KRAB, под контролем специфического промотора	При введении тетрациклин-подобных соединений модуляция экспрессии гена происходит только в клетках, экспрессирующих tTA-KRAB или rtTA-KRAB; система обеспечивает модулирование временно- и пространственно-специфичной обратимой экспрессии гена	Richardson-Jones et al., 2011
Генетические нокины	Введение гена или промоторной последовательности перед геном интереса	Предполагается сохранение экспрессии эндогенного гена интереса	Sachs et al., 2013
Межсекционный трансген	Скрещивание животного с фланкированными LoxP и FRT последовательностями (LoxP-STOP-LoxP-FRT-ген 1-STOP2-FRT-ген 2) и животным с Cre-рекомбиназой под контролем одного специфического промотора и Flp-рекомбиназой под контролем другого	Экспрессия генов зависит от паттерна экспрессии Flp- и Cre-рекомбиназ; позволяет изучать разные подтипы нейронов в нейротрансмиттерных системах	Kim et al., 2009
РНК-интерференция	Введение малых РНК, образующих шпильки (shRNA), для подавления экспрессии гена интереса	Подавляет экспрессию эндогенного гена интереса на короткий срок (несколько дней при однократном введении)	Verheij et al., 2018

При этом векторы должны обеспечивать экспрессию закодированных в них трансгенов только в тех клетках, где синтезируется Cre-рекомбиназа. На сегодняшний день существует более 250 Cre-рекомбиназных линий мышей, доступных в рамках проекта «Экспрессия генов в атласе нервной системы» в сотрудничестве с Интрамуральной программой Национального института психического здоровья (<http://www.gensat.org>) (Gong et al., 2007), а также с

коммерческими репозиториями, такими как Лаборатория Джексона (<http://jaxmice.jax.org>).

Наряду с этим ведутся работы по созданию вирусных векторов, специфично экспрессирующих трансген в серотонинергической системе не только трансгенных животных, но и животных дикого типа или селекционных линий. Так, группой авторов (Benzekhroufa et al., 2009) был создан вектор для серотониновых нейронов, в котором для

усиления уровня экспрессии гена интереса применяли двухступенчатую амплификацию транскрипции (TSTA). В этой системе повышения силы фрагмента промотора *tph2* добиваются включением в него энхансера UAS и химерного цис-регулятора транскрипции GAL4-p65, а также различными вариациями расположения касет энхансеров UAS на промоторе. При помощи такого подхода была достигнута высокая и специфичная экспрессия трансгена в серотониновых нейронах. На основе данных конструкторов получены как лентивирусные, так и аденоассоциированные вирусные векторы для направленного таргетирования (Benzekhoufa et al., 2009). Более того, эти векторы были улучшены за счет оптимизации сайта IRES и добавления последовательности WPRE для повышения уровня экспрессии генов, доставляемых ретровирусными векторами (Nishitani et al., 2019).

Не так давно появилось еще одно интересное направление, позволяющее использовать преимущества вирусной доставки и явление РНК-интерференции. Взаимодействие малых интерферирующих РНК с мРНК целевого гена приводит к разрушению последней, тем самым предотвращая ее трансляцию и угнетая синтез кодируемого ею белка (Rao et al., 2009). Таким образом, миРНК управляет экспрессией гена не на уровне транскрипции, как в уже рассмотренных нами системах, но сразу после нее. Кроме того, эффект после однократного введения миРНК сохраняется на протяжении всего нескольких дней (Albert et al., 2014). Для вирусного таргетирования используют функциональный аналог миРНК – малые РНК, образующие шпильки (shRNA) (Rao et al., 2009). Главной особенностью данной системы является ее таргетность – миРНК будет работать только в тех клетках, где синтезируется мРНК специфичного для нее гена. Однако в этом и основная преграда для их использования: выбираемый ген интереса должен быть эндогенным и специфичным для исследуемой структуры. Тем не менее метод нашел свое применение в исследованиях серотонинергической системы (Gautier et al., 2017; Verheij et al., 2018). Так, при изучении эффектов от подавления экспрессии гена *tph2* в бульбоспинальных серотониновых нейронах была показана их роль в модуляции восприятия невропатической и воспалительной боли (Gautier et al., 2017).

В целом доставка ДНК и/или РНК при помощи рекомбинантных вирусных частиц – многообещающий подход, который может найти применение не только в исследовании серотонинергических нейронов, но и в медицине, в частности в генетической терапии. Однако и он имеет недостатки. В частности, возможно возникновение иммунного ответа организма, в результате чего при повторных инъекциях будет страдать эффективность доставки (Lukashev, Zamyatnin, 2016). Кроме того, проблемой является стереотаксический метод доставки вируса. Инвазивное вмешательство в головной мозг его травмирует, что может негативно сказаться на получаемых результатах.

Оптогенетический и хемогенетический подходы

Описанные выше методы достижения клеточно-специфичной экспрессии генов находят свое применение в

оптогенетике и хемогенетике. Оба подхода позволяют избирательно управлять выбранным типом нейронов для изучения их функций, разрядной активности и сигнальной трансдукции. В оптогенетике гены светочувствительных мембранных ионных каналов или насосов экспрессируются в целевом типе нейронов под клеточно-специфичным промотором. При воздействии светом эти белки меняют проницаемость клеточной мембраны для определенных ионов, что делает возможным управление разрядной активностью клетки с высоким временным разрешением (Lammel et al., 2016). Для изучения серотонинергических нейронов с помощью оптогенетики создана линия ВАС трансгенных мышей *Tph2-ChR2(H134R)-EYFP*, в которой транскрипция деполяризующего мембрану каналородопсина-2 осуществляется под контролем промотора *tph2* (Zhao et al., 2011). Этот же промотор использовался для создания мышей, у которых ген *ChR2* (C128S) находится после тетрациклин-зависимого оператора (*tetO*), тогда как *tTA* находится под контролем промотора *tph2*. При помощи линии мышей с индуцибельной экспрессией каналородопсина в серотониновых нейронах был изучен вклад этих клеток в модуляцию тревожного поведения и ожидания награды (Miyazaki et al., 2014; Ohmura et al., 2014).

Другим, более общим подходом, не требующим создания отдельной линии животных для экспрессии каждого вида опсина в целевых клетках, является использование линий, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под контролем промотора *sert* или *pet-1*. Доставка опсинов в нейроны осуществляется при помощи вирусной трансдукции аденоассоциированными вирусами. Вектор содержит ген опсина в инвертированной ориентации, фланкированный DIO (double-floxed inverted orientation) с двух сторон, а также находящийся под сильным нейрональным промотором *hSyn*. Мышам линии *Sert-Cre* вводили вирусные вектора с деполяризующим каналородопсином (AAV-*hSyn-DIO-ChR2*) и гиперполяризующим галородопсином (AAV-*hSyn-DIO-NpHR*). В результате этого эксперимента была установлена роль серотонинергической системы в снижении социального дефицита на мышинной модели аутизма (Walsh et al., 2018). В других исследованиях при использовании такого же подхода к экспрессии *ChR2* в серотонинергических нейронах дорсального ядра шва была выяснена роль этих клеток в подавлении спонтанной разрядной активности в нейронах обонятельной коры (Lottet et al., 2016), в неврологическом ответе на получение ожидаемой награды (Li et al., 2016), а также в подавлении спонтанной локомоторной активности в открытом поле и снижении скорости движений (Correia et al., 2017). Помимо линии *Sert-Cre*, где для достижения специфичной экспрессии каналородопсина в серотониновых нейронах используется промотор *sert*, в оптогенетических исследованиях применяют аналогичную линию *Pet1-Cre* (Challis et al., 2014; Liu et al., 2014; Luo et al., 2017).

Для доставки оптогенетических белков в серотонинергические нейроны животных, предварительно не подвергавшихся генетическим модификациям, были созданы лентивирусные векторы на основе крысиного и мышинного промоторов *tph2*. Это позволило изучить различия в депрессивно-подобном и тревожном поведении указанных

видов животных при стимуляции нейронов дорсального ядра шва (Nishitani et al., 2019).

В хемогенетике используются рецепторы, сконструированные для взаимодействия с химическими лигандами, инертными в организме. На данный момент среди DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) насчитывается ряд рецепторов, сопряженных с G-белками и представляющих собой модифицированные человеческие мускариновые рецепторы. Такие рецепторы больше не реагируют на ацетилхолин, как, впрочем, и на любые другие эндогенные молекулы, но вместо этого связываются с клозапин-N-оксидом (CNO) (Alexander et al., 2009). Так, например, один из наиболее часто используемых DREADD – hM3Dq, связываясь с CNO, вызывает внутриклеточный каскад через Gq белок и активацию фосфолипазы C, что приводит к деполяризации нейронов и увеличению их разрядной активности (Urban, Roth, 2015). Другой представитель хемогенетических рецепторов – hM4Di, наоборот, способствует ингибированию разрядной активности нейронов через Gi белок (Zhu, Roth, 2014).

В настоящее время доступно несколько вариантов достижения экспрессии DREADD в генетически определенных клетках. Существуют линии генно-инженерных мышей, у которых экспрессия hM3Dq происходит под контролем системы Tet-OFF (Alexander et al., 2009; Garner et al., 2012) и посредством Cre-опосредованной рекомбинации (Teissier et al., 2015). Кроме того, растет число промоторов, которые позволяют осуществлять специфическую для типа клеток экспрессию с использованием многих вирусных векторов, включая модифицированные вирусы простого герпеса (HSV) (Ferguson et al., 2011), аденоассоциированные вирусы (Zhu et al., 2014; Scofield et al., 2015) и лентивирусы (Mahler et al., 2014; Vazey, Aston-Jones, 2014).

Хемогенетический подход для изучения функций серотонинергических нейронов и их проекций уже применен в ряд научных работ. При этом так же, как и в оптогенетике, использовались Sert-Cre линии мышей, которым вводили аденоассоциированные вирусы, содержащие последовательность hM4Di или hM3Dq (AAV-hSyn-DIO-hM4Di/hM3Dq) (Urban et al., 2016; Fernandez et al., 2017; Singh et al., 2017). Например, установлено, что серотонинергические проекции из срединного шва необходимы для регуляции памяти о объектах и процессов синаптической пластичности гиппокампа (Fernandez et al., 2017). В другом исследовании, где подобным образом применяли *ret1-Cre* мышей для хемогенетической активации и ингибирования серотонинергических нейронов, показано, что серотонинергические нейроны в медиальном ядре шва играют ключевую роль в регуляции поведения, подобного тревожности и депрессии (Li et al., 2018).

Заключение

Серотонинергические нейроны в ядрах шва создают сложную и обширную сеть проекций аксонов по всему мозгу. Основная задача анализа этих нейрональных схем заключается в том, чтобы понять, как серотонинергические сети связаны с многочисленными функциями этой нейротрансмиттерной системы. В последние годы было разработано несколько новых методик для манипулиро-

вания субпопуляциями серотонинергических нейронов, созданы различные линии животных со специфической для серотонинергических нейронов экспрессией, разработаны стратегии двойной рекомбинации, эффективные инструменты для временного контроля экспрессии генов, DREADDs и оптогенетика. В зависимости от целей эксперимента исследователи выбирают, каким из доступных вариантов регуляции экспрессии генов воспользоваться, поскольку каждый из них имеет свои достоинства и ограничения. Важно отметить, что ни одна из описанных систем не является полностью свободной от неспецифических эффектов. Для наиболее точной и информативной интерпретации результатов в экспериментальные проекты должны быть включены адекватные контроли. Тем не менее освещенные в этом обзоре инструменты и методы, как по отдельности, так и в сочетании, открывают новые возможности для исследования серотонинергической нейротрансмиттерной системы.

Список литературы / References

- Albert P.R., Vahid-Ansari F., Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:199. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00199.
- Alexander G.M., Rogan S.C., Abbas A.I., Armbruster B.N., Pei Y., Allen J.A., Nonneman R.J., Hartmann J., Moy S.S., Nicolelis M.A., McNamara J.O., Roth B.L. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron.* 2009;63:27-39. DOI 10.1016/j.neuron.2009.06.014.
- Baker K.G., Halliday G.M., Halasz P., Hornung J.-P., Geffen L.B., Cotton R.G.H., Törk I. Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse.* 1991; 7:301-320. DOI 10.1002/syn.890070407.
- Benzekroufa K., Liu B., Tang F., Teschemacher A.G., Kasparov S. Adenoviral vectors for highly selective gene expression in central serotonergic neurons reveal quantal characteristics of serotonin release in the rat brain. *BMC Biotechnol.* 2009;9:23. DOI 10.1186/1472-6750-9-23.
- Blakely R.D. Physiological genomics of antidepressant targets: keeping the periphery in mind. *J. Neurosci.* 2001;21:8319-8323. DOI 10.1523/JNEUROSCI.21-21-08319.2001.
- Calizo L.H., Akanwa A., Ma X., Pan Y., Lemos J.C., Craige C., Heemstra L.A., Beck S.G. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology.* 2011;61:524-543. DOI 10.1016/j.neuropharm.2011.04.008.
- Carlson K.S., Whitney M.S., Gadziola M.A., Deneris E.S., Wesson D.W. Preservation of essential odor-guided behaviors and odor-based reversal learning after targeting adult brain serotonin synthesis. *eNeuro.* 2016;3(5):e0257-16.2016. DOI 10.1523/ENEURO.0257-16.2016.
- Challis C., Beck S.G., Berton O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:43. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00043.
- Choi S., Jonak E., Fernstrom J.D. Serotonin reuptake inhibitors do not prevent 5,7-dihydroxytryptamine-induced depletion of serotonin in rat brain. *Brain Res.* 2004;1007:19-28. DOI 10.1016/J.BRAINRES.2003.12.044.
- Correia P.A., Lottem E., Banerjee D., Machado A.S., Carey M.R., Mainen Z.F. Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *eLife.* 2017;6:e20975. DOI 10.7554/eLife.20975.
- Das A.T., Tenenbaum L., Berkhout B. Tet-On systems for doxycycline-inducible gene expression. *Curr. Gene Ther.* 2016;16:156-167. DOI 10.2174/1566523216666160524144041.

- Deneris E.S. Molecular genetics of mouse serotonin neurons across the lifespan. *Neuroscience*. 2011;197:17-27. DOI 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.08.061.
- Deneris E.S., Wyler S.C. Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat. Neurosci.* 2012;15:519-527. DOI 10.1038/nn.3039.
- Donaldson Z.R., Piel D.A., Santos T.L., Richardson-Jones J., Leonardo E.D., Beck S.G., Champagne F.A., Hen R. Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39:291-302. DOI 10.1038/npp.2013.185.
- Ferguson S.M., Eskenazi D., Ishikawa M., Wanat M.J., Phillips P.E.M., Dong Y., Roth B.L., Neumaier J.F. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat. Neurosci.* 2011;14:22-24. DOI 10.1038/nn.2703.
- Fernandez S.P., Muzerelle A., Scotto-Lomassese S., Barik J., Gruart A., Delgado-García J.M., Gaspar P. Constitutive and acquired serotonin deficiency alters memory and hippocampal synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42:512-523. DOI 10.1038/npp.2016.134.
- Garner A.R., Rowland D.C., Hwang S.Y., Baumgaertel K., Roth B.L., Kentros C., Mayford M. Generation of a synthetic memory trace. *Science*. 2012;335:1513-1516. DOI 10.1126/science.1214985.
- Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003;4:1002-1012. DOI 10.1038/nrn1256.
- Gautier A., El Ouaraki H., Bazin N., Salam S., Vojdani G., Bourgoin S., Pezet S., Bernard J.-F., Hamon M. Lentiviral vector-driven inhibition of 5-HT synthesis in B3 bulbo-spinal serotonergic projections – consequences on nociception, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp. Neurol.* 2017;288:11-24. DOI 10.1016/J.EXPNEUROL.2016.10.016.
- Gong S., Doughty M., Harbaugh C.R., Cummins A., Hatten M.E., Heintz N., Gerfen C.R. Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J. Neurosci.* 2007;27:9817-9823. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2707-07.2007.
- Hainer C., Mosienko V., Koutsikou S., Crook J.J., Gloss B., Kasparov S., Lumb B.M., Alenina N. Beyond gene inactivation: evolution of tools for analysis of serotonergic circuitry. *ACS Chem. Neurosci.* 2016;6:1116-1129. DOI 10.1021/acschemneuro.5b00045.
- Hilber B., Scholze P., Dorostkar M.M., Sandtner W., Holy M., Boehm S., Singer E.A., Sitte H.H. Serotonin-transporter mediated efflux: a pharmacological analysis of amphetamines and non-amphetamines. *Neuropharmacology*. 2005;49:811-819. DOI 10.1016/J.NEUROPHARM.2005.08.008.
- Kim J.C., Cook M.N., Carey M.R., Shen C., Regehr W.G., Dymecki S.M. Linking genetically defined neurons to behavior through a broadly applicable silencing allele. *Neuron*. 2009;63:305-315. DOI 10.1016/j.neuron.2009.07.010.
- Kristianto J., Johnson M.G., Zastrow R.K., Radcliff A.B., Blank R.D. Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 *in vivo*. *Transgenic Res.* 2017;26:411-417. DOI 10.1007/s11248-017-0018-1.
- Lammel S., Dölen G., Malenka R.C. Optogenetic Approaches to Neural Circuit Analysis in the Mammalian Brain. In: Lehner T., Miller B.L., State M.W. (Eds.). *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*. Acad. Press, 2016;221-231. DOI 10.1016/B978-0-12-800105-9.00014-7.
- Li S., Yao W.-Q., Tao Y.-Z., Ma L., Liu X. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus mediate anxiety- and depression-like behavior. *Sheng li xue bao: Acta Physiologica Sinica*. 2018;70:228-236.
- Li Y., Zhong W., Wang D., Feng Q., Liu Z., Zhou J., Jia C., Hu F., Zeng J., Guo Q., Fu L., Luo M. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat. Commun.* 2016;7:10503. DOI 10.1038/ncomms10503.
- Li Z., Yang H.-Y., Wang Y., Zhang M.-L., Liu X.-R., Xiong Q., Zhang L.-N., Jin Y., Mou L.-S., Liu Y., Li R.-F., Rao Y., Dai Y.-F. Generation of tryptophan hydroxylase 2 gene knockout pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *J. Biomed. Res.* 2017;31:445-452. DOI 10.7555/JBR.31.20170026.
- Liu C., Maejima T., Wyler S.C., Casadesus G., Herlitze S., Deneris E.S. Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nat. Neurosci.* 2010;13:1190-1198. DOI 10.1038/nn.2623.
- Liu Z., Zhou J., Li Y., Hu F., Lu Y., Ma M., Feng Q., Zhang J., Wang D., Zeng J., Bao J., Kim J.-Y., Chen Z.-F., El Mestikawy S., Luo M. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*. 2014;81:1360-1374. DOI 10.1016/J.NEURON.2014.02.010.
- Lottem E., Lörincz M.L., Mainen Z.F. Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons rapidly inhibits spontaneous but not odor-evoked activity in olfactory cortex. *J. Neurosci.* 2016;36:7-18. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3008-15.2016.
- Lukashev A.N., Zamyatnin A.A. Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81:700-708. DOI 10.1134/S0006297916070063.
- Luo J., Feng Q., Wei L., Luo M. Optogenetic activation of dorsal raphe neurons rescues the autistic-like social deficits in Shank3 knockout mice. *Cell Res.* 2017;27:950-953. DOI 10.1038/cr.2017.52.
- Mahler S.V., Vazey E.M., Beckley J.T., Keistler C.R., McGlinchey E.M., Kaufling J., Wilson S.P., Deisseroth K., Woodward J.J., Aston-Jones G. Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nat. Neurosci.* 2014;17:577-585. DOI 10.1038/nn.3664.
- Miyazaki K.W., Miyazaki K., Tanaka K.F., Yamanaka A., Takahashi A., Tabuchi S., Doya K. Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr. Biol.* 2014;24:2033-2040. DOI 10.1016/J.CUB.2014.07.041.
- Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H., Bader M., Alenina N. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl. Psychiatry*. 2012;2:e122. DOI 10.1038/tp.2012.44.
- Müller C.P., Jacobs B.L. (Eds.). *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Acad. Press, 2010.
- Muñoz-Jiménez C., Ayuso C., Dobrzynska A., Torres-Mendéz A., de la Cruz Ruiz P., Askjaer P. An efficient FLP-based toolkit for spatiotemporal control of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2017;206:1763-1778. DOI 10.1534/genetics.117.201012.
- Nishitani N., Nagayasu K., Asaoka N., Yamashiro M., Andoh C., Nagai Y., Kinoshita H., Kawai H., Shibui N., Liu B., Hewinson J., Shirakawa H., Nakagawa T., Hashimoto H., Kasparov S., Kaneko S. Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44:721-732. DOI 10.1038/s41386-018-0254-y.
- Ohmura Y., Tanaka K.F., Tsunematsu T., Yamanaka A., Yoshioka M. Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014;17:1777-1783. DOI 10.1017/S1461145714000637.
- Patel P.D., Bochar D.A., Turner D.L., Meng F., Mueller H.M., Pontrello C.G. Regulation of tryptophan hydroxylase-2 gene expression by a bipartite RE-1 silencer of transcription/neuron restrictive silencing factor (REST/NRSF) binding motif. *J. Biol. Chem.* 2007;282:26717-26724. DOI 10.1074/jbc.M705120200.
- Patel P.D., Pontrello C., Burke S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry*. 2004;55:428-433. DOI 10.1016/J.BIOPSYCH.2003.09.002.
- Piszczyk L., Schlax K., Wyrzykowska A., Piszczyk A., Audero E., Thilo Gross C. Serotonin 1A auto-receptors are not sufficient to modulate anxiety in mice. *Eur. J. Neurosci.* 2013;38:2621-2627. DOI 10.1111/ejn.12260.
- Rao D.D., Vorhies J.S., Senzer N., Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61:746-759. DOI 10.1016/J.ADDR.2009.04.004.
- Ren J., Friedmann D., Xiong J., Liu C.D., Deloach K.E., Ran C., Pu A., Sun Y., Weissbourd B., Neve R.L., Horowitz M., Luo L. Anatomy

- cal, physiological, and functional heterogeneity of the dorsal raphe serotonin system. *bioRxiv*. 2018. DOI 10.1101/257378.
- Richardson-Jones J.W., Craigie C.P., Guiard B.P., Stephen A., Metzger K.L., Kung H.F., Gardier A.M., Dranovsky A., David D.J., Beck S.G., Hen R., Leonardo E.D. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron*. 2010;65:40-52. DOI 10.1016/j.neuron.2009.12.003.
- Richardson-Jones J.W., Craigie C.P., Nguyen T.H., Kung H.F., Gardier A.M., Dranovsky A., David D.J., Guiard B.P., Beck S.G., Hen R., Leonardo E.D. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J. Neurosci.* 2011;31:6008-6018. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5836-10.2011.
- Sachs B.D., Jacobsen J.P.R., Thomas T.L., Siesser W.B., Roberts W.L., Caron M.G. The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. *Transl. Psychiatry*. 2013;3:e291. DOI 10.1038/tp.2013.65.
- Scofield M.D., Boger H.A., Smith R.J., Li H., Haydon P.G., Kalivas P.W. Gq-DREADD selectively initiates glial glutamate release and inhibits cue-induced cocaine seeking. *Biol. Psychiatry*. 2015;78:441-451. DOI 10.1016/J.BIOPSYCH.2015.02.016.
- Scott M.M., Krueger K.C., Deneris E.S. A differentially autoregulated Pet-1 enhancer region is a critical target of the transcriptional cascade that governs serotonin neuron development. *J. Neurosci.* 2005;25:2628-2636. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4979-04.2005.
- Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A.V., Kalinina T.S., Agarina N.P., Dygalo N.N. Doxycycline used for control of transgene expression has its own effects on behaviors and Bcl-xL in the rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* First online 2017; Publ. 2018; 38:281-288. DOI 10.1007/s10571-017-0545-6.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89:8794-8797.
- Singh A.K., Zajdel J., Mirrasekian E., Almoosawi N., Frisch I., Klawonn A.M., Jaarola M., Fritz M., Engblom D. Prostaglandin-mediated inhibition of serotonin signaling controls the affective component of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.* 2017;127:1370-1374. DOI 10.1172/JCI90678.
- Teissier A., Chmiakine A., Inbar B., Bagchi S., Ray R.S., Palmiter R.D., Dymecki S.M., Moore H., Ansorge M.S. Activity of raphe serotonergic neurons controls emotional behaviors. *Cell Rep.* 2015;13:1965-1976. DOI 10.1016/J.CELREP.2015.10.061.
- Tye K.M., Deisseroth K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012;13:251-266. DOI 10.1038/nrn3171.
- Urban D.J., Roth B.L. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015;55:399-417. DOI 10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010814-124803.
- Urban D.J., Zhu H., Marcinkiewicz C.A., Michaelides M., Oshibuchi H., Rhea D., Aryal D.K., Farrell M.S., Lowery-Gionta E., Olsen R.H.J., Wetsel W.C., Kash T.L., Hurd Y.L., Tecott L.H., Roth B.L. Elucidation of the behavioral program and neuronal network encoded by dorsal raphe serotonergic neurons. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41:1404-1415. DOI 10.1038/npp.2015.293.
- Vadodaria K.C., Stern S., Marchetto M.C., Gage F.H. Serotonin in psychiatry: *in vitro* disease modeling using patient-derived neurons. *Cell Tissue Res.* 2018;371:161-170. DOI 10.1007/s00441-017-2670-4.
- Vazey E.M., Aston-Jones G. Designer receptor manipulations reveal a role of the locus coeruleus noradrenergic system in isoflurane general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:3859-3864. DOI 10.1073/pnas.1310025111.
- Verheij M.M.M., Contet C., Karel P., Latour J., van der Doelen R.H.A., Geenen B., van Hulten J.A., Meyer F., Kozicz T., George O., Koob G.F., Homberg J.R. Median and dorsal raphe serotonergic neurons control moderate versus compulsive cocaine intake. *Biol. Psychiatry*. 2018;83:1024-1035. DOI 10.1016/J.BIOPSYCH.2017.10.031.
- Walsh J.J., Christoffel D.J., Heifets B.D., Ben-Dor G.A., Selimbeyoglu A., Hung L.W., Deisseroth K., Malenka R.C. 5-HT release in nucleus accumbens rescues social deficits in mouse autism model. *Nature*. 2018;560:589-594. DOI 10.1038/s41586-018-0416-4.
- Weber T., Renzland I., Baur M., Mönks S., Herrmann E., Huppert V., Nürnberg F., Schöning K., Bartsch D. Tetracycline inducible gene manipulation in serotonergic neurons. *PLoS One*. 2012;7:e38193. DOI 10.1371/journal.pone.0038193.
- Whitney M.S., Shemery A.M., Yaw A.M., Donovan L.J., Glass J.D., Deneris E.S. Adult brain serotonin deficiency causes hyperactivity, circadian disruption, and elimination of siestas. *J. Neurosci.* 2016;36:9828-9842. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1469-16.2016.
- Wong-Lin K., Wang D.-H., Moustafa A.A., Cohen J.Y., Nakamura K. Toward a multiscale modeling framework for understanding serotonergic function. *J. Psychopharmacol. (Oxford, England)*. 2017;31:1121-1136. DOI 10.1177/0269881117699612.
- Zhao S., Ting J.T., Atallah H.E., Qiu L., Tan J., Gloss B., Augustine G.J., Deisseroth K., Luo M., Graybiel A.M., Feng G. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat. Meth.* 2011;8:745-752. DOI 10.1038/nmeth.1668.
- Zhu H., Pleil K.E., Urban D.J., Moy S.S., Kash T.L., Roth B.L. Chemogenetic inactivation of ventral hippocampal glutamatergic neurons disrupts consolidation of contextual fear memory. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39:1880-1892. DOI 10.1038/npp.2014.35.
- Zhu H., Roth B.L. Silencing synapses with DREADDs. *Neuron*. 2014;82:723-725. DOI 10.1016/J.NEURON.2014.05.002.
- Zhuang X., Masson J., Gingrich J.A., Rayport S., Hen R. Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J. Neurosci. Meth.* 2005;143:27-32. DOI 10.1016/J.JNEUMETH.2004.09.020.

ORCID ID

U.S. Drozd orcid.org/0000-0002-8539-1463
E.V. Shaburova orcid.org/0000-0001-7795-2534

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-00114 мол_а и бюджетного проекта № 0324-2019-0041.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2018. После доработки 25.02.2019. Принята к публикации 01.03.2019.

Влияние неонатального введения дексаметазона на когнитивные способности взрослых самцов мышей и экспрессию генов в гипоталамусе

Н.П. Бондарь^{1, 2}✉, В.В. Решетников¹, К.В. Бурдеева³, Т.И. Меркулова^{1, 2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирская государственная медицинская академия, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: nbondar@bionet.nsc.ru

Ранний постнатальный период является критическим для развития нервной системы. Стресс в этот период вызывает негативные отдаленные последствия, которые отражаются как на поведенческом, так и на молекулярном уровне. В нашем исследовании для моделирования повышенного уровня глюкокортикоидов, характерного для стрессирующего воздействия в раннем возрасте, мы использовали введение дексаметазона, агониста глюкокортикоидных рецепторов, в понижающих дозах в первые три дня жизни (0.5, 0.3, 0.1 мг/кг, п/к). У взрослых самцов мышей с неонатальным введением дексаметазона было найдено увеличение относительного веса надпочечников и снижение веса тела, при этом базальный уровень кортикостерона в крови не изменялся. Введение дексаметазона в раннем возрасте оказало негативное воздействие на скорость обучения и формирование пространственной памяти в водном лабиринте Морриса у взрослых животных. Мы проанализировали влияние повышенного уровня глюкокортикоидов в раннем возрасте на экспрессию генов *Crh*, *Avp*, *Gr*, *Mr*, участвующих в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), в гипоталамусе взрослых животных. Уровень экспрессии гена минералокортикоидного рецептора (*Mr*) был снижен достоверно, а гена глюкокортикоидного рецептора (*Gr*) – на уровне тенденции ($p = 0.058$) у самцов мышей с неонатальным введением дексаметазона по сравнению с введением физиологического раствора. Уровень экспрессии гена, кодирующего кортикотропин-рилизинг гормон (*Crh*), не изменялся, тогда как экспрессия гена вазопрессина (*Avp*) повышалась под влиянием неонатального введения дексаметазона. Полученные данные демонстрируют возможное нарушение механизмов негативной регуляции ГГНС на уровне гипоталамуса, в которую вовлечены глюкокортикоидный и минералокортикоидный рецепторы. Нарушение функции ГГНС при активации глюкокортикоидной системы в раннем возрасте может быть причиной развития когнитивных нарушений у взрослых животных.

Ключевые слова: неонатальное введение дексаметазона; ГГНС; глюкокортикоидный рецептор; минералокортикоидный рецептор; пространственная память; экспрессия генов.

Для цитирования: Бондарь Н.П., Решетников В.В., Бурдеева К.В., Меркулова Т.И. Влияние неонатального введения дексаметазона на когнитивные способности взрослых самцов мышей и экспрессию генов в гипоталамусе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):456-464. DOI 10.18699/VJ19.514

Effect of neonatal dexamethasone treatment on cognitive abilities of adult male mice and gene expression in the hypothalamus

N.P. Bondar^{1, 2}✉, V.V. Reshetnikov¹, K.V. Burdeeva³, T.I. Merkulova^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: nbondar@bionet.nsc.ru

The early postnatal period is critical for the development of the nervous system. Stress during this period causes negative long-term effects, which are manifested at both behavioral and molecular levels. To simulate the elevated glucocorticoid levels characteristic of early-life stress, in our study we used the administration of dexamethasone, an agonist of glucocorticoid receptors, at decreasing doses at the first three days of life (0.5, 0.3, 0.1 mg/kg, s.c.). In adult male mice with neonatal dexamethasone treatment, an increase in the relative weight of the adrenal glands and a decrease in body weight were observed, while the basal level of corticosterone remained unchanged. Dexamethasone treatment in early life had a negative impact on the learning and spatial memory of adult mice in the Morris water maze. We analyzed the effect of elevated glucocorticoid levels in early life on the expression of the *Crh*, *Avp*, *Gr*, and *Mr* genes involved in the regulation of the HPA axis in the hypothalami of adult mice. The expression level of the mineralocorticoid receptor gene (*Mr*) was significantly downregulated, and the glucocorticoid receptor gene (*Gr*) showed a tendency towards decreased expression ($p = 0.058$) in male mice neonatally treated with dexamethasone, as compared with saline administration. The expression level of the *Crh* gene encoding corticotropin-

releasing hormone was unchanged, while the expression of the vasopressin gene (*Avp*) was increased in response to neonatal administration of dexamethasone. The obtained results demonstrate a disruption of negative feedback regulation of the HPA axis, which involves glucocorticoid and mineralocorticoid receptors, at the level of the hypothalamus. Malfunction of the HPA axis as a result of activation of the glucocorticoid system in early life may cause the development of cognitive impairment in the adult mice.

Key words: neonatal dexamethasone treatment; HPA; glucocorticoid receptor; mineralocorticoid receptor; spatial memory; gene expression.

For citation: Bondar N.P., Reshetnikov V.V., Burdeeva K.V., Merkulova T.I. Effect of neonatal dexamethasone treatment on cognitive abilities of adult male mice and gene expression in the hypothalamus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):456-464. DOI 10.18699/VJ19.514 (in Russian)

Введение

Хорошо известно, что ранний постнатальный период чрезвычайно важен для развития центральной нервной системы и формирования поведенческого фенотипа (Teicher et al., 2016). В частности, в клинических исследованиях показано, что стрессорные события в раннем детстве могут оказывать негативное влияние на когнитивные и эмоциональные функции индивидуума, в том числе и во взрослом возрасте (Pervanidou, Chrousos, 2018; Weems et al., 2018). Исследования на грызунах также выявили связь раннего постнатального стресса с развитием ряда поведенческих и когнитивных нарушений у взрослых животных (Ladd et al., 2000; Lehmann, Feldon, 2000; Schmidt, 2010). Поскольку гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС) играет ключевую роль в реакции организма на стресс, предполагается, что отдаленные по времени эффекты стресса могут быть связаны с длительными изменениями в функционировании различных звеньев этой системы (De Kloet, 2013; Pervanidou, Chrousos, 2018).

Согласно классической схеме, активация ГГНС в ответ на стресс начинается с усиления экспрессии генов *Crh* и *Avp* в паравентрикулярном ядре (PVN) гипоталамуса. Продукты этих генов, кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ, CRH) и вазопрессин (AVP), стимулируют экспрессию гена *Pomc* и секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ) передней долей гипофиза (Harno et al., 2018). АКТГ, в свою очередь, стимулирует синтез глюкокортикоидных гормонов надпочечниками (van Bodegom et al., 2017; Gjerstad et al., 2018). В мозге действие этих гормонов опосредовано рецепторами глюкокортикоидов (ГР) и минералокортикоидов (МР) (De Kloet, 2013). ГР экспрессируются во всех структурах мозга, с максимумом в CRH-нейронах PVN гипоталамуса и кортикотрофах аденогипофиза (Sapolsky et al., 1983; van Eekelen et al., 1991). Известно, что активация ГР в этих клетках, ингибируя, соответственно, экспрессию генов *Crh* и *Pomc* (Drouin et al., 1993; Malkoski, Dorin, 1999), запускает механизм отрицательной обратной связи, снижающий активность ГГНС и завершающий реакцию организма на гормональный сигнал (McEwen et al., 1992). Экспрессия МР происходит в основном в лимбической системе, достигая наивысшего уровня в гиппокампе (Sapolsky et al., 1983; van Eekelen et al., 1991). Предполагается, что МР также принимает участие в контроле активности ГГНС за счет как «проактиваторной» обратной связи, вовлеченной в поддержание ее базального уровня активности, так и контроля ингибиторного влияния гиппокампа на функцию ГГНС (Berardelli et al., 2013). Хорошо известно уча-

стие ГР и МР в формировании когнитивных функций, эмоциональных и поведенческих реакций (De Kloet, 2013; Paul et al., 2015).

Уровень глюкокортикоидов может изменяться под действием различных стрессорных факторов в раннем возрасте или введения препаратов, влияющих на активность ГГНС. Одна из наиболее популярных моделей стресса в раннем возрасте – длительное отделение детенышей от матерей (на 3 ч в день, maternal separation) в первые две недели жизни. В экспериментах на грызунах установлено, что такой стресс приводит к существенным поведенческим и когнитивным нарушениям у взрослых животных (Pryce, Feldon, 2003; Aisa et al., 2007; Suri et al., 2013; Bondar et al., 2018), а также оказывает отсроченное действие на экспрессию генов, участвующих в ответе на стресс (Reshetnikov et al., 2018b). При изучении влияния эффектов такого стресса на экспрессию генов ГГНС у взрослых животных было обнаружено снижение экспрессии *Gr* в гиппокампе (Ladd et al., 2004; Aisa et al., 2007), фронтальной коре (Navailles et al., 2010) и стриатуме (Wong et al., 2015), а также усиление экспрессии *Avp* в PVN гипоталамуса (Sanchez et al., 2001; Ladd et al., 2004; Murgatroyd et al., 2009). В предыдущей работе мы показали усиление экспрессии *Avp* в гипоталамусе взрослых мышей с опытом отделения от матерей в раннем постнатальном периоде. Кроме того, у этих животных было обнаружено снижение количества mRNA *Crhr1* в гиппокампе и увеличение соотношения *Mr/Gr* mRNA в гиппокампе и гипоталамусе (Reshetnikov et al., 2018b).

Введение синтетического глюкокортикоидного гормона дексаметазона в первые дни после рождения используют также для моделирования раннего постнатального стресса на грызунах (Wong et al., 2015; Yates et al., 2016). В экспериментах на крысах хорошо изучены нарушения в поведении, возникающие у таких животных. Для них показаны изменения в тревожном и депрессивном поведении, нарушения процессов обучения и памяти (Kamphuis et al., 2004; Neal et al., 2004; Claessens et al., 2012; Vazquez et al., 2012; Ko et al., 2014). Немногочисленные работы на мышах выявляют изменения в тревожном поведении и нарушение распознавания новых объектов (Li et al., 2014a). Несмотря на большое количество исследований последствий неонатального введения глюкокортикоидов, данные об их отдаленном влиянии на экспрессию генов, участвующих в ответе на стресс, достаточно фрагментарны, особенно это касается исследований на мышах. В нескольких работах были показаны отсроченные эффекты такого «фармакологического» стресса на отдельные гены ГГНС: снижение количества ГР в стриатуме

мышей (Wong et al., 2015), снижение экспрессии гена *Gr* в гиппокампе у крыс (Vazquez et al., 2012). Однако такая важная для функционирования ГГНС структура мозга, как гипоталамус, пока остается малоизученной в контексте отдаленных эффектов неонатального повышения уровня глюкокортикоидов. В настоящей работе для исследования последствий активации ГГНС на ранних стадиях развития животных мы использовали фармакологический подход, включающий в себя прямую активацию глюкокортикоидной системы с помощью введения синтетического глюкокортикоида дексаметазона.

Задачей нашего исследования было оценить влияние неонатального введения дексаметазона на когнитивные способности взрослых мышей, а также проследить отставленное влияние препарата на экспрессию ключевых генов, регулирующих работу ГГНС на уровне гипоталамуса. Сравнение полученных данных с аналогичным экспериментом по отдаленным последствиям стресса в раннем возрасте (стресс отделения от матери) (Reshetnikov et al., 2018b) позволит оценить сходство и различие этих двух типов воздействия на организм.

Материалы и методы

Животные. Эксперимент проведен на мышах линии C57Bl/6. Животные содержались в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI62117X0015) (Новосибирск, Россия) при фиксированном световом режиме 12:12 ч. Корм и воду животные получали без ограничения. Все процедуры с животными проводились в соответствии с Международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-EEC), Российскими правилами работы с лабораторными животными (№ 267 от 19.06.2003), а также были одобрены этической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 39 от 27 сентября 2017 г.).

Схема эксперимента. Процедуру введения дексаметазона (KRKA, Словения) начинали с первого дня постнатального развития (PND1), принимая день родов за PND0. Инъекции дексаметазона проводили по следующей схеме: в первый день в дозе 0.5 мкг на 1 г массы, во второй – 0.3 мкг на 1 г массы, в третий – 0.1 мкг на 1 г массы. Контрольной группе производили инъекции физиологического раствора (10 мкл на мышь). Все инъекции выполняли подкожно один раз в сутки с 9 до 10 ч утра. Схема введения препарата и использованные дозы выбраны на основании предыдущих исследований (Kamphuis et al., 2003; Ko et al., 2014; Li et al., 2014a, b).

На PND30 детенышей отсаживали от матери и содержали однопольными однопольными группами до начала тестирования. В дальнейшем эксперименте использовали только самцов. Все экспериментальные процедуры проводили на взрослых мышах (~PND90). Для исследования уровня экспрессии генов и оценки когнитивных способностей использовались разные группы животных. Животные первой группы (по 6 особей в группе) были забиты быстрой декапитацией. Кровь собирали, выделяли и взвешивали надпочечники, выделяли гипоталамус и замораживали при -70°C . Для получения сыворотки кровь выдерживали при комнатной температуре в течение

1 ч, после этого центрифугировали на 3000 g 10 мин, сыворотку собирали и хранили при -70°C до применения. Относительную массу надпочечников определяли как отношение суммарной массы двух надпочечников (в мг) к массе животного (в г). Вторая группа животных (17 самцов с неонатальным введением физиологического раствора, 7 самцов с неонатальным введением дексаметазона) была протестирована в «Водном лабиринте Морриса».

Тест «Водный лабиринт Морриса» оценивает способность животных к формированию и сохранению пространственной памяти (Morris, 1984; Vorhees, Williams, 2006). Водный лабиринт Морриса состоит из бассейна диаметром 100 см, на внутренних стенках которого расположены четыре равноудаленных пространственных маркера, размещенных таким образом, чтобы бассейн был разделен на четыре сектора (целевой, противоположный, сектор 1 и сектор 2). В целевом секторе бассейна была установлена платформа диаметром 10 см, погруженная чуть ниже поверхности воды. Вода в бассейне подкрашивалась путем добавления сухого молока, чтобы платформа оставалась скрытой. Температура воды была $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Обучение состояло из четырех сеансов в день и проводилось в одно и то же время суток на протяжении 4 дней (всего 16 попыток). Во время каждой попытки мышь опускали в один из четырех секторов и позволяли в течение 1 мин найти скрытую под водой платформу. Если мышь не могла самостоятельно найти платформу за время теста, экспериментатор аккуратно подводил к ней животное. После обнаружения платформы животное оставляли на ней на 15 с для запоминания пространственных сигналов. Затем мышь отдыхала в клетке в течение 15 с и проводилась следующая попытка обучения. Расположение платформы на протяжении всего эксперимента не менялось. На пятый день (тестовая попытка) платформу убрали, а мышь помещали в противоположный целевому сектор и в течение 60 с оценивали время, проведенное в каждом секторе. Тест записывался и обрабатывался с использованием программного обеспечения EthoStudio (Куликов и др., 2005).

Выделение РНК и проведение ПЦР в режиме реального времени. Из замороженных образцов ткани выделяли РНК с использованием TRIzol Reagent (Ambion, США) согласно протоколу производителя. Очистку РНК проводили с помощью парамагнитных частиц RNAClean XP beads (Beckman Coulter, Германия) и растворяли в бидистиллированной воде. Качество и количество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) использовали готовые наборы производства «Синтол», Россия. В реакцию брали 1 мкг РНК, все процедуры проводили согласно протоколам производителя.

Экспрессию генов оценивали с помощью ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Мы оценили экспрессию генов глюкокортикоидного (*Gr*, *Nr3c1*) и минералокортикоидного (*Mr*, *Nr3c2*) рецепторов, гена кортикотропин-рилизинг фактора (*Crh*), а также гена вазопрессина (*Avp*). Результаты ПЦР анализировали $\Delta\Delta\text{Ct}$ методом и нормализовали на экспрессию референсного гена актина (*Actb*). Для генов *Avp*, *Gr* и *Mr* применяли метод детекции продуктов амплификации с использованием

Таблица 1. Последовательности использованных праймеров

Ген		Последовательность (5'→3')		Размер продукта, bp
<i>Gr (Nr3c1)</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i>	For	ATGTATGACCAATGTAAACACA	132
		Rev	GCTCTTCAGACCTTCCTTAG	
<i>Mr (Nr3c2)</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2</i>	For	GTGTGTGGAGATGAGGC	155
		Rev	GGACAGTTCTTTCTCCGAAT	
<i>Crh</i>	<i>Corticotropin releasing hormone</i>	For	GGAGAAGAGAGCGCCCTAA	152
		Rev	AAGAAATCAAGGGCTGCGG	
		Probe	5,6-ROX-ATGCTGCTGGTGGCTCTGTCGTCC-3BHQ-2	
<i>Avp</i>	<i>Arginine vasopressin</i>	For	TCTCCGCTGTTTCCTGAGC	230
		Rev	GGGAGGTAGTTCTCCTCCT	
<i>Actb</i>	<i>Beta-actin</i>	For	TATTGGCAACGAGCGGTTCC	140
		Rev	TGGCATAGAGGTCTTTACGG	
		Probe	5,6-ROX-CCAGCCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCC-3BHQ-2	

EVAGreen, для гена *Crh* – метод детекции с помощью TaqMan зондов. Праймеры и зонды (табл. 1) были подобраны в программах Primer BLAST (NCBI) и PrimerQuest design tool (IDT Technology). Параметры реакции были следующие: первоначальная денатурация кДНК на 95 °C в течение 5 мин, последующие 38 циклов – денатурация при 95 °C в течение 15 с, отжиг праймеров и элонгация при 60 °C в течение 20 с. Для систем с интеркалирующим красителем EVAGreen после завершения реакции амплификации специфичность полученных продуктов оценивали с помощью кривой плавления. Каждую реакцию проводили в трех повторах. Эффективность амплификации каждой пары праймеров составляла от 90 до 110 %.

Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли иммуноферментным анализом с помощью Corticosterone ELISA Kit (Enzo, Нью-Йорк, США) согласно протоколам производителя. Каждую реакцию проводили в двух повторах.

Статистическую обработку результатов теста «Водный лабиринт Морриса» выполняли с помощью дисперсионного анализа ANOVA и Fisher's LSD в качестве post hoc анализа. Сравнительный анализ массы животных, относительной массы надпочечников, уровня кортикостерона и уровня экспрессии генов проводили с помощью *t*-test Стьюдента. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия между экспериментальными группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$, на уровне тенденции – при $p < 0.1$. Данные анализировали в пакете программ Statistica 6.0.

Результаты

Масса животных, относительная масса надпочечников и уровень кортикостерона. В группе с неонатальным введением дексаметазона масса тела животных была ниже [$t(1, 35) = 4.54, p < 0.001$], относительная масса надпочечников была повышена [$t(1, 35) = 2.26, p = 0.030$], а уровень кортикостерона не отличался [$t(1, 10) = 0.84, p = 0.419$] от группы с введением физиологического раствора (рис. 1).

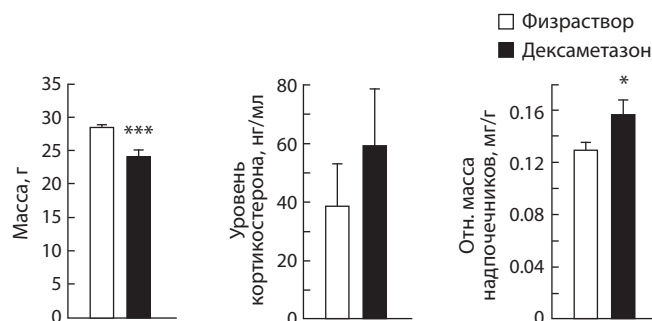


Рис. 1. Влияние неонатального введения дексаметазона на массу тела, уровень кортикостерона и относительную массу надпочечников у взрослых мышей.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с группой с введением физиологического раствора.

Тест «Водный лабиринт Морриса». Исследование взрослых животных с неонатальным введением дексаметазона в данном тесте выявило, что введение препарата в раннем возрасте замедлило процессы обучения в течение тренировочных попыток и нарушило ориентацию в пространстве по уже выученным сигналам. Дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил влияние фактора «препарат» на длительность поиска платформы в тесте «Водный лабиринт Морриса». Мыши с неонатальным введением дексаметазона тратили достоверно больше времени на поиск платформы по сравнению с контролем: 7-я попытка [$F(1, 24) = 7.65, p = 0.011$], 9-я попытка [$F(1, 24) = 6.48, p = 0.018$], 10-я попытка [$F(1, 24) = 10.08, p = 0.004$], 11-я попытка [$F(1, 24) = 10.18, p = 0.004$], 12-я попытка [$F(1, 24) = 10.74, p = 0.003$], 13-я попытка [$F(1, 24) = 5.02, p = 0.034$], 14-я попытка [$F(1, 24) = 4.63, p = 0.042$] (рис. 2, а).

Тестовая попытка, когда площадка убирается из бассейна, проводилась через сутки после последнего предъявления лабиринта. Способность к запоминанию оценивалась по предпочтению сектора, где раньше находилась платформа, по сравнению с остальными секторами. Диспер-

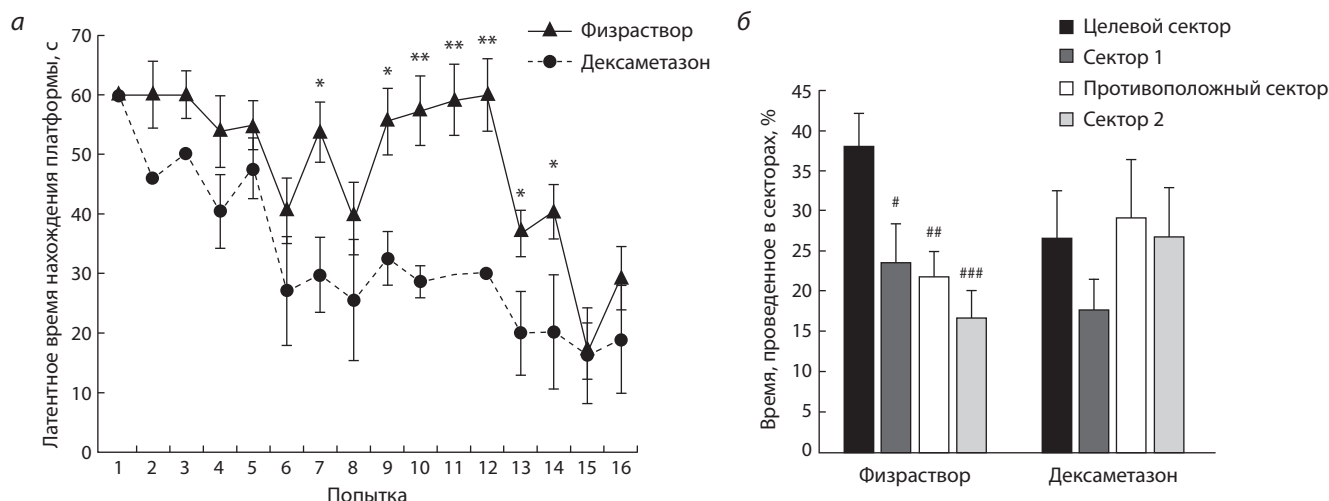


Рис. 2. Влияние неонатального введения дексаметазона на поведение взрослых самцов мышей в тесте «Водный лабиринт Морриса». а – латентное время нахождения платформы в течение ежедневных обучающих попыток (16 попыток); б – время, проведенное в каждом секторе в течение тестовой попытки (% от общего времени попытки).

Во время тестовой попытки платформа убирается и мышь помещается в водный лабиринт на 60 с. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с группой с введением физиологического раствора; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ по сравнению со временем, проведенным в целевом секторе.

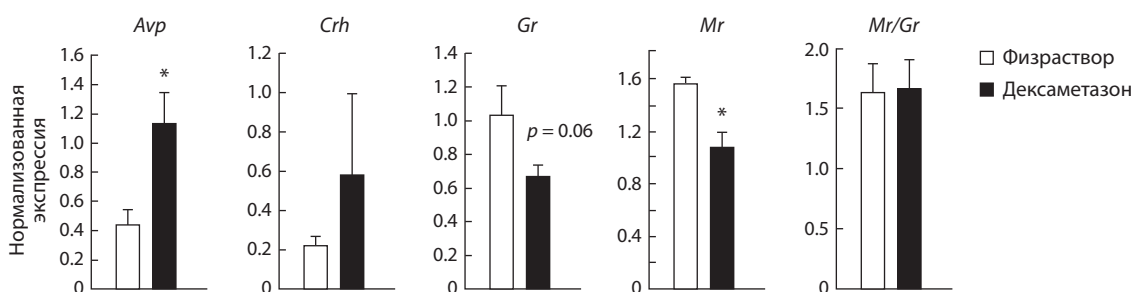


Рис. 3. Влияние неонатального введения дексаметазона на уровень экспрессии генов в гипоталамусе взрослых животных.

Уровень экспрессии генов *Avp*, *Crh*, *Gr* и *Mr* нормализован на уровень экспрессии гена *Actb*. * $p < 0.05$ по сравнению с группой с введением физиологического раствора.

сионный анализ показал различие в предпочтении секторов в группе с введением физиологического раствора [$F(3, 68) = 5.25, p = 0.003$] и отсутствие различий в предпочтении секторов в группе с неонатальным введением дексаметазона [$F(3, 28) = 0.71, p = 0.549$]. Мыши с введением физиологического раствора предпочитали целевой сектор по сравнению со всеми остальными секторами (целевой vs сектор 1, $p = 0.013$; целевой vs противоположный, $p = 0.006$; целевой vs сектор 2, $p = 0.001$). Мыши с введением дексаметазона в раннем возрасте не демонстрировали предпочтение целевого сектора и проводили равное время во всех секторах водного лабиринта, что говорит о нарушении способности к запоминанию (см. рис. 2, б).

Изменение экспрессии генов глюкокортикоидной системы в гипоталамусе. В нашей работе мы оценили экспрессию основных генов глюкокортикоидной системы – глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов, кортикотропин-рилизинг фактора и *Avp*, также участвующего в регуляции выброса АКТГ в гипоталамусе. В группе мышей с неонатальным введением дексаметазона уровень экспрессии как глюкокортикоидного (*Gr*) [$t(1, 8) = 2.21, p = 0.058$, тенденция], так и

минералокортикоидного (*Mr*) [$t(1, 8) = 3.28, p = 0.011$] рецепторов был ниже, чем в контроле, однако соотношение мРНК этих рецепторов (*Mr/Gr*) между собой не изменилось. Экспрессия гена *Avp* у мышей с неонатальным введением дексаметазона была выше, чем в контрольной группе [$t(1, 8) = 2.47, p = 0.039$], а экспрессия гена *Crh* не изменилась (рис. 3).

Обсуждение

Чрезмерная активация ГГНС на ранней стадии жизни, вызванная стрессом или введением глюкокортикоидов, приводит к значительным изменениям в структурах мозга и поведении взрослых животных. Наше исследование показало, что введение в первые дни жизни дексаметазона, агониста ГР, приводит к нарушению пространственной памяти у мышей во взрослом возрасте. Это сопровождается изменением в активности ГГНС, поскольку мы обнаружили снижение экспрессии генов *Gr* и *Mr* в гипоталамусе взрослых животных. Глюкокортикоиды и минералокортикоиды вовлечены в регуляцию ответа на стресс и отвечают за отрицательную обратную связь при активации ГГНС, поэтому снижение их экспрессии гово-

рит о возможном нарушении негативной регуляции гормонального ответа в гипоталамусе.

Известно, что эффекты экзогенных ГР сильно зависят от вида животного, стадии развития ГГНС и дозы препарата. Крысы с введением высокой дозы дексаметазона на 5–10-й день жизни демонстрируют снижение неophobia и тревожности в тесте «свет–темнота» и открытое поле без изменения двигательной активности взрослых животных (Yates et al., 2016). В то же время введение низких доз дексаметазона в первые три дня жизни может вызывать усиление тревожного поведения (Neal et al., 2004; Vazquez et al., 2012) и признаков депрессивного поведения у крыс (Ko et al., 2014; Li et al., 2014b) или, напротив, не оказывать влияния на двигательную активность, тревожное и социальное поведение крыс во взрослом возрасте (Kamphuis et al., 2004). Немногочисленные исследования на мышах демонстрируют, что взрослые мыши линии ICR с неонатальным введением дексаметазона в низких дозах в первые три дня жизни проявляют повышенную тревожность при неизменной двигательной и исследовательской активности (Li et al., 2014a). При этом наши исследования с введением низких доз дексаметазона на мышах другой линии – C57Bl6, наоборот, показали снижение тревожного поведения при аналогичном режиме введения дексаметазона (Batluk et al., 2018), что говорит о различной чувствительности линий мышей. Наиболее стабильным и характерным эффектом как неонатального, так и пренатального введения дексаметазона, который находят практически во всех исследованиях вне зависимости от вида используемых животных, является задержка физического развития и снижения массы тела животных (Neal et al., 2004; Lin et al., 2006; Wang et al., 2010; Vazquez et al., 2012; Chiu et al., 2018). Аналогичный результат получен и в нашем исследовании: взрослые мыши с неонатальным введением дексаметазона имели сниженную массу тела по сравнению с контролем. Возможно, это связано с прямым эффектом дексаметазона на катаболизм белков (Weiler et al., 1997; Leret et al., 2004) и соответствующим нарушением роста мышц и формирования костного скелета (Swolin-Eide et al., 2002), происходящим под влиянием введения препарата.

В данной работе мы выявили увеличение относительной массы надпочечников у взрослых животных с неонатальным введением дексаметазона. Поскольку уровень кортикостерона у взрослых животных не изменился, то увеличение массы надпочечников, скорее всего, связано со снижением массы тела животных, хотя мы не можем исключить и вероятность изменения активности ГГНС под влиянием введения дексаметазона в раннем возрасте.

В мозге грызунов наибольшее число глюкокортикоидных рецепторов расположено в гиппокампе, и особенно в зоне CA1, именно поэтому нейроны этой зоны наиболее чувствительны к воздействию глюкокортикоидов (van Eekelen et al., 1991). На мышах и крысах было показано, что даже небольшие дозы дексаметазона приводят к усилению активности каспазы-3 и апоптоза в гиппокампе и коре сразу после введения препарата (Feng et al., 2009; Bhatt et al., 2013; Lanshakov et al., 2016), снижают число нейронов в коре и гиппокампе (Kreider et al., 2006; Tijsseling et al., 2013) к 21-му дню жизни, а также могут

изменять в гиппокампе соотношение субъединиц NMDA-рецептора (Kamphuis et al., 2003), влияя на нейрональную пластичность. Неонатальное влияние дексаметазона на гиппокамп приводит к развитию когнитивных нарушений. В экспериментах на крысах с неонатальным введением дексаметазона отчетливо показано снижение скорости обучения и нарушение формирования пространственной памяти при тестировании в водном лабиринте Морриса (Ferguson et al., 2001; Kamphuis et al., 2003; Machhor et al., 2004; Qaheri et al., 2013), нарушение кратковременной памяти (Claessens et al., 2012), сниженное обучение в тестах на пассивное избегание (Lin et al., 2006; Wang et al., 2010; Chiu et al., 2018) и нарушение распознавания знакомых и незнакомых партнеров (Kamphuis et al., 2004; Wang et al., 2010). На мышах повреждение когнитивных способностей было показано только на примере нарушения распознавания новых объектов (Li et al., 2014a). Наше исследование одно из первых, показавшее нарушение обучения и пространственной памяти у взрослых мышей под влиянием введения дексаметазона в раннем возрасте. У мышей снижается скорость обучения, уже на второй день предъявления теста они позже находят платформу, чем контрольные животные. И через сутки после последнего предъявления теста они не предпочитают целевой сектор, где находилась платформа, демонстрируя нарушения долговременной пространственной памяти.

В ранний период жизни мыши и крысы характеризуются пониженной реакцией на стресс (гипочувствительный период) вследствие низкого базального уровня АКТГ и кортикостерона в крови и сниженного количества глюкокортикоидных рецепторов в тканях (Levine, 1994). Поэтому в раннем возрасте в ответ на большинство слабых стимулов, например изоляцию, новую ситуацию или инъекцию физраствора, не происходит активации ГГНС. Однако сильный стресс, например длительное отделение детенышей от матери, или же введение небольших доз дексаметазона приводит к чрезмерной активации ГГНС, что, в свою очередь, ведет к нарушению нормального развития организма. Введение глюкокортикоидов в раннем возрасте часто не меняет базальный уровень кортикостерона у взрослых животных, аналогично полученным нами результатам (Neal et al., 2004; Claessens et al., 2012; Vazquez et al., 2012), однако реакция на стресс изменяется. Так, введение низких доз дексаметазона в постнатальный период приводит к сглаженному выбросу кортикостерона в ответ на стресс во взрослом возрасте (Felszeghy et al., 2000; Flagel et al., 2002; Mesquita et al., 2009; Vazquez et al., 2012), а возвращение кортикостерона к базальному уровню происходит с задержкой (Neal et al., 2004).

В нашей работе мы оценили экспрессию генов, связанных с регуляцией активности ГГНС на уровне гипоталамуса: *Gr*, *Mr*, *Avp* и *Crh*. Мы показали снижение экспрессии генов *Gr* и *Mr* у мышей с неонатальным введением дексаметазона. Уровень экспрессии гена кортикотропин-рилизинг гормона *Crh* достоверно не различается между группами, однако уровень экспрессии гена *Avp*, продукт которого также участвует в регуляции синтеза АКТГ (Aguilera, Rabadan-Diehl, 2000), был достоверно повышен в группе с введением дексаметазона. При этом базальный уровень кортикостерона в крови между группами

Таблица 2. Сравнение эффектов длительного отделения от матерей в раннем возрасте (MS) и эффектов неонатального введения дексаметазона

Параметры	MS*	Дексаметазон
Масса тела	=	Снижается
Относительная масса надпочечников	=	Повышается
Уровень кортикостерона	=	=
Уровень экспрессии генов в гипоталамусе		
<i>Gr</i>	=	Тенденция к снижению
<i>Mr</i>	=	Снижается
Соотношение mRNA <i>Mr/Gr</i>	Повышается	=
<i>Avp</i>	Повышается	Повышается
<i>Crh</i>	=	=
Водный лабиринт Морриса		
Обучение	=	Снижается
Долговременная память	Снижается	Снижается

* Сравнение с (Reshetnikov et al., 2018b). Знак «=» – отсутствие изменений параметра.

не отличается из-за больших разбросов внутри групп и не коррелирует с уровнем экспрессии *Crh*, хотя и имеет тенденцию к повышению. Уровень ГР напрямую связан с динамикой гормонального ответа на стресс у животных. При повышении уровня кортикостерона в крови активация ГР в гипоталамусе приводит к снижению выброса КРГ и, соответственно, АКТГ в гипофизе, нормализуя уровень стрессовых гормонов (De Kloet et al., 1998). Снижение экспрессии гена *Gr* в гипоталамусе, показанное в нашей работе, может приводить и к снижению уровня самого ГР, что, в свою очередь, приводит к нарушению механизмов восстановления нормального гормонального уровня после воздействия стресса. Снижение уровня экспрессии *Gr* или количества его белкового продукта в разных отделах мозга находят в некоторых работах по отставленным эффектам введения глюкокортикоидов. Так, у крыс с неонатальным введением дексаметазона было найдено снижение уровня экспрессии *Gr* в гиппокампе (Vazquez et al., 2012), а также показано снижение способности ГР связывать гормон в гиппокампе и гипоталамусе (Felszeghy et al., 1996). Снижение количества ГР было выявлено и в стриатуме мышей после введения дексаметазона в раннем возрасте (Wong et al., 2015). Однако, по нашим сведениям, снижение экспрессии генов *Gr* и *Mr* в гипоталамусе у мышей с неонатальным введением дексаметазона ранее показано не было. Таким образом, наши данные дополняют картину отставленных изменений в ГГНС после неонатального введения дексаметазона.

Поскольку введение дексаметазона в первые дни жизни может имитировать стресс, перенесенный в раннем возрасте, мы сравнили полученные данные с нашей предыдущей работой по влиянию стресса в ранний период жизни на когнитивные способности и экспрессию генов в гипоталамусе у мышей (табл. 2) (Reshetnikov et al., 2018b).

В отличие от неонатального введения дексаметазона, длительное отделение детенышей от матерей в первые две недели жизни не меняет скорость обучения в водном лабиринте Морриса – мыши обучались находить скрытую платформу так же быстро, как контрольная группа. Однако через сутки животные не могли выбрать сектор, где была ранее расположена платформа, что говорит о нарушении долговременной пространственной памяти. Таким образом, неонатальное введение дексаметазона вызывает более глубокие нарушения когнитивных способностей, чем просто стресс отделения от матери, поскольку затрагивает как процесс обучения, так и процесс воспроизведения заученной информации. Сравнивая с доступными данными по другим аспектам когнитивных функций, можно отметить схожие нарушения в распознавании новых объектов, показанные как под влиянием стресса в раннем возрасте (Reshetnikov et al., 2018a), так и при неонатальном введении дексаметазона (Li et al., 2014a).

Более сильные отдаленные эффекты неонатального введения глюкокортикоидов, чем раннего постнатального стресса, можно видеть и при сравнении изменений в экспрессии генов. Так, экспрессия генов *Gr* и *Mr* не изменялась под влиянием стресса в раннем возрасте, но снижалась при неонатальном введении дексаметазона. Стресс в раннем возрасте привел к увеличению соотношения *Mr/Gr* как в гипоталамусе, так и в гиппокампе за счет небольшого повышения экспрессии *Mr*, что, возможно, объясняет более слабое влияние данного стресса на обучение, поскольку баланс этих рецепторов участвует в ответе на стресс и формировании долговременной памяти (De Kloet, 2013). Под влиянием неонатального введения дексаметазона соотношение *Mr/Gr* не изменилось, снижение экспрессии одного типа рецепторов сопровождается снижением экспрессии другого типа, не приводя к компенсаторному изменению баланса рецепторов, направленному на восстановление нормальной функции ГГНС. Экспрессия *Avp* под влиянием неонатального введения дексаметазона повышается в два раза сильнее, чем в случае раннего постнатального стресса, а экспрессия *Crh* не изменяется при обоих видах воздействия. Таким образом, неонатальное введение дексаметазона приводит к более сильным отдаленным последствиям как на когнитивные способности, так и на экспрессию генов в гипоталамусе, по сравнению со стрессом отделения от матерей в первые недели жизни.

Заключение

Наши результаты показали, что у мышей с неонатальным введением дексаметазона во взрослом возрасте снижается скорость обучения и нарушается формирование пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. При этом у взрослых мышей с неонатальным введением дексаметазона был найден пониженный уровень экспрессии генов *Gr* и *Mr* и повышенный уровень экспрессии *Avp* в гипоталамусе, что может говорить о долговременных нарушениях в регуляции ГГНС. Ранний постнатальный стресс отделения от матери и постнатальное введение дексаметазона приводят к односторонним изменениям когнитивных способностей и функции ГГНС у взрослых животных, но неонатальное введение дексаметазона вы-

зывает более сильные отставленные изменения, что, вероятно, связано с разным уровнем активации ГГНС при этих воздействиях.

Список литературы / References

- Куликов А.В., Куликов В.А., Базовкина Д.В. Цифровая обработка визуальной информации в поведенческом эксперименте. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*. 2005;55(1):126-132. [Kulikov A.V., Kulikov V.A., Bazovkina D.V. Digital registration and analysis of visual information in behavioral experiment. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2005;55(1):126-132. (in Russian)]
- Aguilera G., Rabadan-Diehl C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul. Pept.* 2000;96(1-2):23-29.
- Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Rio J., Ramirez M.J. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(3):256-266. DOI 10.1016/j.psyneuen.2006.12.013.
- Batluk U.I., Burdеева K.V., Degtyareva A.O., Dolganova O.M., Ershov N.I., Merkulova T.I., Bondar N.P. The long-term consequences of early-life dexamethasone treatment on the cognitive ability of male mice and gene expression in the hippocampus. In: 11th Int. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2018). Novosibirsk, August 20–25. Novosibirsk, 2018;7.
- Berardelli R., Karamouzis I., D'Angelo V., Zichi C., Fussotto B., Giordano R., Ghigo E., Arvat E. Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine*. 2013;43(1):51-58. DOI 10.1007/s12020-012-9750-8.
- Bhatt A.J., Feng Y., Wang J., Famuyide M., Hersey K. Dexamethasone induces apoptosis of progenitor cells in the subventricular zone and dentate gyrus of developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* 2013;91(9):1191-1202. DOI 10.1002/jnr.23232.
- Bondar N.P., Lepeshko A.A., Reshetnikov V.V. Effects of early-life stress on social and anxiety-like behaviors in adult mice: sex-specific effects. *Behav. Neurol.* 2018;2018:1538931. DOI 10.1155/2018/1538931.
- Chiu H.F., Chan M.W.Y., Cheng C.Y., Chou J.L., Lin J.M., Yang Y.L., Lu K.T. Neonatal dexamethasone treatment suppresses hippocampal estrogen receptor α -expression in adolescent female rats. *Mol. Neurobiol. Publ. online* 2018. Publ. 2019;56:2224-2233. DOI 10.1007/s12035-018-1214-6.
- Claessens S.E., Daskalakis N.P., Oitzl M.S., de Kloet E.R. Early handling modulates outcome of neonatal dexamethasone exposure. *Horm. Behav.* 2012;62(4):433-441. DOI 10.1016/j.yhbeh.2012.07.011.
- De Kloet E.R. Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *Eur. J. Pharmacol.* 2013;719(1-3):53-62. DOI 10.1016/j.ejphar.2013.04.053.
- De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 1998;19(3):269-301. DOI 10.1210/edrv.19.3.0331.
- Drouin J., Sun Y.L., Chamberland M., Gauthier Y., De Lean A., Nemer M., Schmidt T.J. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* 1993;12(1):145-156.
- Felszeghy K., Bagdy G., Nyakas C. Blunted pituitary-adrenocortical stress response in adult rats following neonatal dexamethasone treatment. *J. Neuroendocrinol.* 2000;12(10):1014-1021.
- Felszeghy K., Gaspar E., Nyakas C. Long-term selective down-regulation of brain glucocorticoid receptors after neonatal dexamethasone treatment in rats. *J. Neuroendocrinol.* 1996;8(7):493-499.
- Feng Y., Rhodes P.G., Liu H., Bhatt A.J. Dexamethasone induces neurodegeneration but also up-regulates vascular endothelial growth factor A in neonatal rat brains. *Neuroscience*. 2009;158(2):823-832. DOI 10.1016/j.neuroscience.2008.10.024.
- Ferguson S.A., Paule M.G., Holson R.R. Neonatal dexamethasone on day 7 in rats causes behavioral alterations reflective of hippocampal, but not cerebellar, deficits. *Neurotoxicol. Teratol.* 2001;23(1):57-69.
- Fligel S.B., Vazquez D.M., Watson S.J., Jr., Neal C.R., Jr. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002;282(1):R55-63. DOI 10.1152/ajpregu.2002.282.1.R55.
- Gjerstad J.K., Lightman S.L., Spiga F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*. 2018;21(5):403-416. DOI 10.1080/10253890.2018.1470238.
- Harno E., Gali Ramamoorthy T., Coll A.P., White A. POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. *Physiol. Rev.* 2018;98(4):2381-2430. DOI 10.1152/physrev.00024.2017.
- Kamphuis P.J., Croiset G., Bakker J.M., Van Bel F., Van Ree J.M., Wiegant V.M. Neonatal dexamethasone treatment affects social behaviour of rats in later life. *Neuropharmacology*. 2004;47(3):461-474. DOI 10.1016/j.neuropharm.2004.04.008.
- Kamphuis P.J., Gardoni F., Kamal A., Croiset G., Bakker J.M., Cattabeni F., Gispen W.H., van Bel F., Di Luca M., Wiegant V.M. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: involvement of the NMDA receptor complex. *FASEB J.* 2003;17(8):911-913. DOI 10.1096/fj.02-0333fj.
- Ko M.C., Hung Y.H., Ho P.Y., Yang Y.L., Lu K.T. Neonatal glucocorticoid treatment increased depression-like behaviour in adult rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014;17(12):1995-2004. DOI 10.1017/S1461145714000868.
- Kreider M.L., Tate C.A., Cousins M.M., Oliver C.A., Seidler F.J., Slotkin T.A. Lasting effects of developmental dexamethasone treatment on neural cell number and size, synaptic activity, and cell signaling: critical periods of vulnerability, dose-effect relationships, regional targets, and sex selectivity. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(1):12-35. DOI 10.1038/sj.npp.1300783.
- Ladd C.O., Huot R.L., Thirivikraman K.V., Nemeroff C.B., Meaney M.J., Plotsky P.M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog. Brain Res.* 2000;122:81-103.
- Ladd C.O., Huot R.L., Thirivikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol. Psychiatry*. 2004;55(4):367-375. DOI 10.1016/j.biopsych.2003.10.007.
- Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain. *Neurobiol. Dis.* 2016;91:1-9. DOI 10.1016/j.nbd.2016.02.009.
- Lehmann J., Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev. Neurosci.* 2000;11(4):383-408.
- Leret M.L., Peinado V., Suarez L.M., Tecedor L., Gamallo A., Gonzalez J.C. Role of maternal adrenal glands on the developing serotonergic and aminoacidergic systems of the postnatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2004;22(2):87-93. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2003.12.005.
- Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994;746:275-288; discussion 289-293.
- Li S.X., Fujita Y., Zhang J.C., Ren Q., Ishima T., Wu J., Hashimoto K. Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiol. Dis.* 2014a;62:124-134. DOI 10.1016/j.nbd.2013.09.004.
- Li S.X., Zhang J.C., Wu J., Hashimoto K. Antidepressant effects of ketamine on depression-like behavior in juvenile mice after neonatal dexamethasone exposure. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 2014b;412(2):124-127. DOI 10.9758/cpn.2014.12.2.124.
- Lin H.J., Huang C.C., Hsu K.S. Effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. *Ann. Neurol.* 2006;59(6):939-951. DOI 10.1002/ana.20885.

- Machhor N., Balaji T., Raju T.N. Postnatal dexamethasone and long term learning and memory functions in developing rats: effect of postnatal age and gender. *Life Sci.* 2004;74(15):1925-1935. DOI 10.1016/j.lfs.2003.09.044.
- Malkoski S.P., Dorin R.I. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol. Endocrinol.* 1999;13(10):1629-1644. DOI 10.1210/mend.13.10.0351.
- McEwen B.S., Gould E.A., Sakai R.R. The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress. *Br. J. Psychiatry.* 1992;160(S15):18-23.
- Mesquita A.R., Wegerich Y., Patchev A.V., Oliveira M., Leao P., Sousa N., Almeida O.F. Glucocorticoids and neuro- and behavioural development. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2009;14(3):130-135. DOI 10.1016/j.siny.2008.11.002.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1984;11(1):47-60.
- Murgatroyd C., Patchev A.V., Wu Y., Micale V., Bockmuhl Y., Fischer D., Holsboer F., Wotjak C.T., Almeida O.F., Spengler D. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat. Neurosci.* 2009;12(12):1559-1566. DOI 10.1038/nn.2436.
- Navailles S., Zimnisky R., Schmauss C. Expression of glucocorticoid receptor and early growth response gene 1 during postnatal development of two inbred strains of mice exposed to early life stress. *Dev. Neurosci.* 2010;32(2):139-148. DOI 10.1159/000293989.
- Neal C.R., Jr., Weidemann G., Kabbaj M., Vazquez D.M. Effect of neonatal dexamethasone exposure on growth and neurological development in the adult rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;287(2):R375-385. DOI 10.1152/ajpregu.00012.2004.
- Paul S., Jeon W.K., Bizon J.L., Han J.S. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. *Front. Aging Neurosci.* 2015;7:43. DOI 10.3389/fnagi.2015.00043.
- Pervanidou P., Chrousos G.P. Early-life stress: from neuroendocrine mechanisms to stress-related disorders. *Horm. Res. Paediatr.* 2018; 89(5):372-379. DOI 10.1159/000488468.
- Pryce C.R., Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003;27(1-2):57-71. DOI 10.1016/S0149-7634(03)00009-5.
- Qaheri S.N., Ali A.B., Alalwaan A.A., Ahmed F.A., Ahmed M.M., Kamal A.H. Neonatal dexamethasone exposure in rats resulted in hippocampal learning and memory defects with decreased convulsion threshold later in adult life. *Neurosciences (Riyadh).* 2013;18(4): 388-390.
- Reshetnikov V.V., Lepeshko A.A., Ryabushkina J.A., Studenikina A.A., Merkulova T.I., Bondar N.P. The long-term effects of early postnatal stress on cognitive abilities and expression of genes of the glutamatergic system in mice. *Neurochem. J.* 2018a;12(2):142-151. DOI 10.1134/S1819712418020095.
- Reshetnikov V.V., Studenikina A.A., Ryabushkina J.A., Merkulova T.I., Bondar N.P. The impact of early-life stress on the expression of HPA-associated genes in the adult murine brain. *Behaviour.* 2018b; 155(2-3):181-203. DOI 10.1163/1568539X-00003482.
- Sanchez M.M., Ladd C.O., Plotsky P.M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev. Psychopathol.* 2001;13(3):419-449.
- Sapolsky R.M., McEwen B.S., Rainbow T.C. Quantitative autoradiography of [3H]corticosterone receptors in rat brain. *Brain Res.* 1983; 271(2):331-334.
- Schmidt M.V. Molecular mechanisms of early life stress – lessons from mouse models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010;34(6):845-852. DOI 10.1016/j.neubiorev.2009.05.002.
- Suri D., Veenit V., Sarkar A., Thiagarajan D., Kumar A., Nestler E.J., Galande S., Vaidya V.A. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol. Psychiatry.* 2013;73(7):658-666. DOI 10.1016/j.biopsych.2012.10.023.
- Swolin-Eide D., Dahlgren J., Nilsson C., Albertsson Wikland K., Holmang A., Ohlsson C. Affected skeletal growth but normal bone mineralization in rat offspring after prenatal dexamethasone exposure. *J. Endocrinol.* 2002;174(3):411-418.
- Teicher M.H., Samson J.A., Anderson C.M., Ohashi K. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016;17(10):652-666. DOI 10.1038/nrn.2016.111.
- Tijsseling D., Camm E.J., Richter H.G., Herrera E.A., Kane A.D., Niu Y., Cross C.M., de Vries W.B., Derks J.B., Giussani D.A. Statins prevent adverse effects of postnatal glucocorticoid therapy on the developing brain in rats. *Pediatr. Res.* 2013;74(6):639-645. DOI 10.1038/pr.2013.152.
- van Bodegom M., Homberg J.R., Henckens M. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front. Cell. Neurosci.* 2017;11:87. DOI 10.3389/fncel.2017.00087.
- van Eekelen J.A., Bohn M.C., de Kloet E.R. Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon. *Dev. Brain Res.* 1991;61(1):33-43.
- Vazquez D.M., Neal C.R., Jr., Patel P.D., Kaciroti N., Lopez J.F. Regulation of corticoid and serotonin receptor brain system following early life exposure of glucocorticoids: long term implications for the neurobiology of mood. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(3):421-437. DOI 10.1016/j.psyneuen.2011.07.012.
- Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 2006;1(2):848-858. DOI 10.1038/nprot.2006.116.
- Wang Y.C., Huang C.C., Hsu K.S. The role of growth retardation in lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. *PLoS One.* 2010;5(9):e12806. DOI 10.1371/journal.pone.0012806.
- Weems C.F., Russell J.D., Neill E.L., McCurdy B.H. Annual research review: pediatric posttraumatic stress disorder from a neurodevelopmental network perspective. *J. Child Psychol. Psychiatry.* First publ. 2018. Publ. 2019;60(4):395-408. DOI 10.1111/jcpp.12996.
- Weiler H.A., Wang Z., Atkinson S.A. Whole body lean mass is altered by dexamethasone treatment through reductions in protein and energy utilization in piglets. *Biol. Neonate.* 1997;71(1):53-59. DOI 10.1159/000244397.
- Wong P., Sze Y., Gray L.J., Chang C.C., Cai S., Zhang X. Early life environmental and pharmacological stressors result in persistent dysregulations of the serotonergic system. *Front. Behav. Neurosci.* 2015;9:94. DOI 10.3389/fnbeh.2015.00094.
- Yates N.J., Robertson D., Rodger J., Martin-Iverson M.T. Effects of neonatal dexamethasone exposure on adult neuropsychiatric traits in rats. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167220. DOI 10.1371/journal.pone.0167220.

ORCID ID

N.P. Bondar orcid.org/0000-0002-5602-5149
V.V. Reshetnikov orcid.org/0000-0002-2932-0804

Благодарности. Работа поддержана Российским научным фондом, проект 16-15-10131.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2018. После доработки 17.02.2019. Принята к публикации 20.02.2019.

Генетические основы предрасположенности к депрессивным расстройствам

Ю.Д. Давыдова¹✉, Р.Ф. Еникеева¹, А.В. Казанцева¹, Р.Н. Мустафин^{2, 3}, А.Р. Романова⁴, С.Б. Малых⁵, Э.К. Хуснутдинова^{1, 2}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра

Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

³ Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

⁴ Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета, Стерлитамак, Россия

⁵ Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

✉ e-mail: julia.dmitrievna@list.ru

Депрессия – это распространенное психическое расстройство, которое является одной из ведущих причин нетрудоспособности и смертности в мире. Несмотря на интенсивные исследования, проводимые в течение последних десятилетий, этиология депрессивных расстройств все еще остается не до конца изученной, однако генетические факторы, безусловно, играют важную роль в предрасположенности к депрессии. Настоящий обзор сфокусирован на результатах работ, основанных на генно-кандидатном подходе, полногеномных (Genome-Wide Association Studies, GWAS) и полноэкзомных (Whole Exome Sequencing, WES) исследованиях, продемонстрировавших связь полиморфных локусов генов с депрессивными расстройствами. Согласно первому подходу, формирование депрессивной симптоматики находится под влиянием генов серотонинергической (*TPH1*, *TPH2*, *HTR1A*, *HTR2A*, *SLC6A4*), дофаминергической (*DRD4*, *SLC6A3*) и норадренергической (*SLC6A2*) систем, а также генов ферментов их метаболизма (*MAOA*, *COMT*). Кроме того, имеются данные об участии генов гипоталамо-гипофизарной системы (*OXTR*, *AVPR1A*, *AVPR1B*) и рецепторов половых гормонов (*ESR1*, *ESR2*, *AR*), генов нейротрофического фактора мозга (*BDNF*) и фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), нейронального апоптоза (*CASP3*, *BCL-XL*, *BAX*, *NPY*, *APP*, *GRIN1*) и воспалительной системы (*TNF*, *CRP*, *IL6*, *IL1B*, *PSMB4*, *PSMD9*, *STAT3*) в развитии депрессивных расстройств. Результаты второго подхода (GWAS и WES) демонстрируют, что гены белков пикколо (*PCLO*) и сиртуина (*SIRT1*), фактора пролиферации стволовых клеток (*GNL3*), гликозилтрансферазы (*GLT8D1*), α-трипсинового ингибитора (*ITIH3*), мелатонинового рецептора (*MTNR1A*), костного морфогенного белка (*BMP5*), ломкой гистидинового триады (*FHIT*) и киназного супрессора (*KSR2*), протокадгерина (*PCDH9*) и активатора транскрипции *AUTS2*, преимущественно участвующие в процессах нейрогенеза и клеточной адгезии, вовлечены в развитие депрессии. Таким образом, эти и другие литературные данные подтверждают, что формирование генетической предрасположенности к депрессивным расстройствам – сложный процесс, затрагивающий функционирование большого числа генов, в том числе тех, которые ранее не обсуждались в связи с депрессией, что требует обратить особое внимание на них в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: депрессивное расстройство; серотонин; гипоталамо-гипофизарная система; нейротрофин; апоптоз; цитокины; GWAS; полноэкзомное секвенирование.

Для цитирования: Давыдова Ю.Д., Еникеева Р.Ф., Казанцева А.В., Мустафин Р.Н., Романова А.Р., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. Генетические основы предрасположенности к депрессивным расстройствам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):465-472. DOI 10.18699/VJ19.515

Genetic basis of depressive disorders

Yu.D. Davydova¹✉, R.F. Enikeeva¹, A.V. Kazantseva¹, R.N. Mustafin^{2, 3}, A.R. Romanova⁴, S.B. Malykh⁵, E.K. Khusnutdinova^{1, 2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

² Bashkir State University, Ufa, Russia

³ Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

⁴ Sterlitamak Branch of the Bashkir State University, Sterlitamak, Russia

⁵ Psychological Institute of Russian Academy of Education, Moscow, Russia

✉ e-mail: julia.dmitrievna@list.ru

Depression is a common mental disorder being one of the main causes of disability and mortality worldwide. Despite an intensive research during the past decades, the etiology of depressive disorders (DDs) remains incompletely understood; however, genetic factors are significantly involved in the liability to depression. The present review is focused on the studies based on a candidate gene approach, genome-wide association studies (GWAS) and whole exome sequencing (WES), which previously demonstrated associations between gene polymorphisms and DDs. According to the first approach, DD development is affected by serotonergic (*TPH1*, *TPH2*, *HTR1A*, *HTR2A*, and *SLC6A4*), dopaminergic (*DRD4*, *SLC6A3*) and noradrenergic (*SLC6A2*) system genes, and genes of enzymatic degradation (*MAOA*, *COMT*). In addition, there is evidence of the involvement of HPA-axis genes (*OXTR*, *AVPR1A*, and

AVPR1B), sex hormone receptors genes (*ESR1*, *ESR2*, and *AR*), neurotrophin (*BDNF*) and methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genes, neuronal apoptosis (*CASP3*, *BCL-XL*, *BAX*, *NPY*, *APP*, and *GRIN1*) and inflammatory system (*TNF*, *CRP*, *IL6*, *IL1B*, *PSMB4*, *PSMD9*, and *STAT3*) genes in DD development. The results of the second approach (GWAS and WES) revealed that the *PCLO*, *SIRT1*, *GNL3*, *GLT8D1*, *ITIH3*, *MTNR1A*, *BMP5*, *FHIT*, *KSR2*, *PCDH9*, and *AUTS2* genes predominantly responsible for neurogenesis and cell adhesion are involved in liability to depression. Therefore, the findings discussed suggest that genetic liability to DD is a complex process, which assumes simultaneous functioning of multiple genes including those reported previously, and requires future research in this field.

Key words: depressive disorder; serotonin; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; neurotrophin; apoptosis; cytokines; GWAS; whole-exome sequencing.

For citation: Davydova Yu.D., Enikeeva R.F., Kazantseva A.V., Mustafin R.N., Romanova A.R., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Genetic basis of depressive disorders. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):465–472. DOI 10.18699/VJ19.515 (in Russian)

Введение

Согласно экспертным оценкам Всемирной организации здравоохранения, нестабильные социальные, экономические и экологические факторы в современном обществе неуклонно влекут за собой рост числа заболеваний, получивших название социально значимых, особое внимание отводится депрессивным расстройствам (ДР). Это связано, прежде всего, с высоким распространением депрессии среди населения, ежегодным увеличением заболеваемости, трудностями диагностики, профилактики и лечения данного заболевания (Смулевич, 2015). Кроме того, депрессия – одна из ведущих причин нетрудоспособности в мире. В настоящее время насчитывается более 322 млн человек из всех возрастных групп, страдающих ДР, причем общее количество индивидов с депрессивным расстройством за последнее десятилетие увеличилось более чем на 18.4 %. Возрастающей проблемой, связанной с депрессией, является суицидальное поведение (СП) – вторая по значимости причина смерти среди людей в возрасте 15–29 лет (WHO, 2017).

Депрессия – психическое расстройство, характеризующееся патологически сниженным настроением, торможением интеллектуальной и моторной деятельности, снижением витальных побуждений с пессимистической оценкой себя, положения в окружающей действительности и своего будущего (Смулевич, 2015). Различные медицинские классификаторы выдвигают множество диагностических критериев депрессии. Международная классификация болезней (МКБ-10) диагностирует депрессию (F32 – депрессивный эпизод) в зависимости от числа и тяжести симптомов, к основным из которых относятся: сниженное настроение, ангедония, упадок сил и повышенная утомляемость, психомоторная заторможенность или возбуждение, идеи виновности и уничижения, суицидальные мысли, снижение концентрации внимания и половой мотивации, нарушения сна и аппетита (Смулевич, 2015; МКБ-10, 2018).

Наиболее распространенные валидизированные шкалы для оптимальной диагностики ДР в современной клинической практике – госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS), шкала Гамильтона (Hamilton Depression Rating Scale, HAM-D), шкала Бека (Beck Depression Inventory, BDI), шкала Монгомери-Асберг (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale, MADRS), которые используются по необходимости врачами-психиатрами с последующей разработкой актуальной стратегии лечения (Cusin et al., 2010).

Многофакторная природа депрессивных расстройств

Депрессия является многофакторным психическим расстройством, предрасположенность к которому определяется действием широкого спектра психологических, социальных, нейробиологических и наследственных факторов и их взаимодействием между собой (Смулевич, 2015). Согласно результатам близнецовых исследований, коэффициент наследуемости депрессии составляет 29–46 % для различных ДР (Kendler et al., 2006). Среди психосоциальных предикторов ДР традиционно выделяют особый стиль негативного мышления индивида, для которого характерно сосредоточение на отрицательных аспектах жизни, конфликтный характер детско-родительских взаимоотношений в период воспитания, материнская депрессия или большое число стрессовых событий в личной жизни (Daches et al., 2018). Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что развитие депрессии может быть связано с реакцией личности на факт существования определенного психического расстройства (Kim et al., 2018) и вызванную им социальную дезадаптацию. Достаточно широко распространена точка зрения, согласно которой ДР могут быть причиной или следствием подавления гнева и агрессии (Sahu et al., 2014).

Интересными представляются данные, сообщающие о гендер-специфичности ДР. Показано, что женщины в два раза чаще страдают депрессией по сравнению с мужчинами (WHO, 2017). Это связано с различиями в деятельности нервной и эндокринной систем, а также в транскрипционных профилях генов мужчин и женщин (Gerhard, Duman, 2018). Кроме того, предполагается, что подобная частота может быть обусловлена тем, что мужчины значительно реже обращаются за врачебной помощью при появлении симптомов депрессии (Girgus, Yang, 2015).

Нейрофизиологические исследования депрессивных расстройств

В рамках нейрофизиологического подхода к изучению ДР важную роль играет выявление первичного дефекта в структурах головного мозга, участвующих в регуляции эмоционального фона и мотивации. Однако данные о подобных нейрофизиологических маркерах в настоящее время немногочисленны, что обусловлено значительной клинической и этиологической гетерогенностью ДР.

Функциональные, структурные и post-mortem исследования свидетельствуют о том, что аномалии в субгенуальной части поясной извилины являются наиболее

устойчивыми нейрофизиологическими маркерами ДР. Уменьшение объема или увеличение метаболической активности в субгенуальной части отмечено у пациентов на ранних стадиях заболевания и у индивидов, в семейном анамнезе которых были зафиксированы случаи депрессии (Hajek et al., 2008). С помощью магнитно-резонансной томографии показано уменьшение объема лобных областей, особенно в передней части поясной извилины, орбитофронтальной и префронтальной коре, а также уменьшение объемов гиппокампа, скорлупы и хвостатого ядра у пациентов с ДР (Koolschijn et al., 2009). Кроме того, в патофизиологию ДР вовлечены височная и островковая доли, а также мозжечок, в которых отмечено снижение активности (Fitzgerald et al., 2008).

Более чем у половины больных депрессией выявлены значительные нарушения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Так, в гипоталамусе больных обнаружено увеличение количества нейронов, продуцирующих кортикотропин-рилизинг-гормон, хроническое повышение уровня которого усиливает токсические повреждения моноаминергических нейронов, что ведет к уменьшению их количества при депрессии (Naughton et al., 2014).

Молекулярно-генетические исследования депрессивных расстройств

Гены моноаминергических систем мозга. Гипотеза дефицита моноаминергической нейротрансмиссии при ДР, предложенная еще в 60-х годах прошлого столетия, способствовала изучению полиморфных локусов генов, вовлеченных в нейромедиаторный обмен и участвующих в синтезе, деградации или нейротрансмиссии серотонина, дофамина и норадреналина (Gatt et al., 2015; Shadrina et al., 2018). В связи с противоречивостью результатов о вовлеченности того или иного гена в развитие ДР и для систематизации ранее опубликованных результатов были проведены мета-анализы (Kishi et al., 2013; Zhao et al., 2014; Liu et al., 2016; Wang et al., 2016; Bleys et al., 2018; Culverhouse et al., 2018; Rui et al., 2018; Taylor, 2018), позволившие количественно подтвердить или опровергнуть гипотезы о вовлеченности конкретного гена в развитие ДР (таблица). Согласно результатам мета-анализов, с риском развития ДР ассоциированы полиморфные варианты гена-переносчика серотонина (*SLC6A4*), рецептора 1A (*HTR1A*) и 2A серотонина (*HTR2A*), триптофангидроксилазы (*TPH2*), переносчика дофамина (*SLC6A3*), рецептора D4 дофамина (*DRD4*), переносчика норэпинефрина (*SLC6A2*), моноаминоксидазы А (*MAOA*), катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*).

Роль гена метилентетрагидрофолатредуктазы. Метилентетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) – один из ключевых ферментов метаболизма фолата и метионина в организме, которые, в свою очередь, играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Ген, кодирующий метилентетрагидрофолатредуктазу (*MTHFR*; 1p36.22), традиционно рассматривается как кандидатный при изучении тревожного и биполярного расстройств, шизофрении и депрессии (Gatt et al., 2015). Как известно, активность этого фермента может снижаться в результате нуклеотидных замен в структуре гена *MTHFR*. Одной из таковых

является транзигция $677C > T$ (*rs1801133*), обуславливающая замену *Ala222Val* в каталитическом домене фермента и ведущая к снижению активности фермента до 35 % (Weisberg et al., 1998). Впоследствии в ряде мета-анализов была подтверждена ассоциация аллеля *rs1801133*Т* с риском развития ДР (Rai, 2017).

Роль гена нейротрофического фактора мозга. Кроме классических путей нейромедиаторной передачи, в настоящее время представляются интересными исследования генетики ферментов, вовлеченных в регуляцию нейротоксического и нейропротекторного ответов на стресс. Нейротрофические факторы (нейротрофины) – большая группа полипептидов, играющих ключевую роль в развитии и сохранении структур центральной нервной системы (ЦНС) (Pорова et al., 2017), среди которых в мозге наиболее распространен нейротрофический фактор мозга *BDNF*, кодируемый одноименным геном *BDNF* (11p14.1). Известно, что полиморфный локус *Val66Met* ($196G > A$; *rs6265*) является функциональным: наличие аллеля **Met* ассоциировано с пониженным уровнем нейротрофического фактора в префронтальной коре и стволе мозга, а также с повышенным риском развития депрессии по сравнению с носителями аллеля **Val* (Youssef et al., 2018). Ранее был отмечен модулирующий эффект таких средовых факторов, как хронический стресс, жестокое обращение в детстве, травмы головного мозга, сезон рождения, на ассоциацию локуса *Val66Met* с риском развития ДР (Bilc et al., 2018) и повышенной тревожности (Kazantseva et al., 2015).

Роль генов нейронального апоптоза. Изучение нейронального апоптоза как важнейшего явления, лежащего в основе поддержания клеточного гомеостаза в НС, приобретает все большую актуальность в связи с ростом психических расстройств в обществе. В настоящее время имеются немногочисленные исследования на модельных объектах, указывающих на связь процессов нейронального апоптоза с депрессией и стрессом, которые могут послужить основой для проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований у человека. Например, в коре головного мозга крыс, испытывавших хронический мягкий стресс, было выявлено повышение уровня каспазы-3 (ген *CASP3*) – фермента протеолитической системы, индуцирующего процессы апоптоза в клетках (Bachis et al., 2008). Имеются также данные, что при длительном воздействии стресса отмечается пониженная экспрессия антиапоптотического гена *BCL-XL* и повышенная экспрессия проапоптотического гена *BAX*, тогда как снижение стресса индуцировало экспрессию генов нейротрофического фактора мозга (*BDNF*), фактора роста нервов (*VEGF*) и нейропептида (*NPY*) в гиппокампе (Jiang et al., 2014).

Кроме перечисленных инвазивных подходов к изучению молекулярных механизмов сложных патофизиологических состояний, существуют и другие, в частности реконструкция и анализ ассоциативных генных сетей, описывающих взаимосвязи между молекулярно-генетическими объектами, ассоциированными с нейрональным апоптозом. Так, в ходе анализа приоритизации генов нейронального апоптоза было установлено, что в регуляции нейронального апоптотического процесса участвуют продукты таких генов, как *BDNF*, который обладал наибольшим приоритетом в исследовании, глутаматного

Результаты мета-анализов полиморфных локусов генов моноаминергических систем с развитием депрессивных расстройств

Ген	Полиморфный локус	Группа сравнения	Кол-во работ (N) ¹	OR ² (p) ³	Аллель/генотип риска	Литературный источник
TPH2 (12q21.1)	rs4570625	G vs. T	6 (2754)	0.83 (0.001)	G	Gatt et al., 2015
	rs17110747	A vs. G	5 (2536)	0.84 (0.02)	A	
HTR1A (5q12.3)	rs6295	C vs. G	15 (9732)	0.87 (0.007)	C	Kishi et al., 2013
	rs878567	C vs. T	5 (4775)	0.83 (0.0002)	C	
HTR2A (13q14.2)	rs6311	A vs. G/G	15 (5539)	1.20 (0.03)	A	Zhao et al., 2014
SLC6A4 (17q11.2)	5-HTTLPR	S vs. L	51 (51449)	1.18 (< 0.0001)	S	Bleys et al., 2018
			31 (38802)	1.25 (0.02)		Culverhouse et al., 2018
DRD4 (11p15.5)	VNTR 48 п. н.	2R vs. (3R, 4R, 5R, 6R, 7R)	5 (1132)	1.73 (0.0003)	2R	Gatt et al., 2015
SLC6A3 (5p15.33)	VNTR 40 п. н.	9/10 vs. 10/10	3 (423)	2.06 (< 0.01)	9/10	»
SLC6A2 (16q12.2)	rs5569	A/A vs. G	18 (8798)	1.19 (0.02)	A/A	Rui et al., 2018
MAOA (Xp11.3)	VNTR 30 п. н.	L vs. S	9 (4223)	1.23 (0.03)	L	Gatt et al., 2015
	rs1137070	T vs. C	39 (18824)	1.26 (0.0006)	T	Liu et al., 2016
COMT (22q11)	rs4680	Val vs. Met/Met	17 (5308)	1.18 (0.02)	Val	Wang et al., 2016
		Val vs. Met	49 (10925)	0.98 (0.68)	–	Taylor, 2018

Примечание. ¹N – количество индивидов, включенных в мета-анализ; ²OR – отношение шансов; ³p – уровень значимости (p-value).

рецептора *GRIN1*, предшественника β -амилоида *APP*, коагуляционного фактора *F2R*, трансмембранного белка семейства опухолевого некроза *FASLG*, а также транскрипционного коактиватора для стероидных и ядерных рецепторов *PPARGC1A*. Большинство из этих генов ранее не обсуждалось в литературе в связи с ДР, ввиду чего они представляют большой интерес для дальнейших экспериментальных исследований депрессивных состояний (Янкина и др., 2017).

Роль генов гипоталамо-гипофизарной системы. Другое важнейшее звено, участвующее в регуляции психических функций, – гипоталамо-гипофизарная система, ключевыми компонентами которой являются окситоцин и вазопрессин. Следует отметить, что концентрационный баланс между окситоцином и вазопрессином регулирует различные виды эмоциональных реакций, а его нарушение описано при тревоге, аутизме и депрессии (Neumann, Landgraf, 2012). Действие окситоцина опосредуется его взаимодействием с одноименным рецептором (OXTR). К одним из наиболее изучаемых полиморфных локусов в гене *OXTR* относится замена $G > A$ (*rs53576*) в 3-м интроне, которая, как известно, ассоциирована с особенностями социального поведения, а также с ДР (Kushner et al., 2018). Так, установлено, что у носителей генотипа $*G/*G$ чаще выявляется депрессивная симптоматика (Kushner et al., 2018).

Значительно меньше данных о вовлечении вазопрессина в развитие депрессии. Известно, что широкий спектр «психологических» функций вазопрессина (ген *AVP*) реализуется посредством его связывания с двумя типами рецепторов: *V1A* (*AVPR1A*) и *V1B* (*AVPR1B*), экспрессия которых отмечена в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса (Neumann, Landgraf, 2012).

В исследованиях post-mortem установлено, что у пациентов с ДР повышен уровень экспрессии генов *AVP* и *AVPR1A* (Wang et al., 2008), тогда как ассоциативные исследования вовлеченности полиморфных локусов гена *AVPR1B* в развитие ДР и тревожности продемонстрировали противоречивые результаты (Казанцева и др., 2014).

Роль генов половых гормонов и их рецепторов. Как отмечалось ранее, существуют убедительные доказательства гендер-специфичности депрессии (Girgus et al., 2015; Gerhard, Duman, 2018). В связи с этим изучение эффектов половых гормонов, оказываемых на психику человека, приобретает все большую популярность. Эстрогены – группа женских половых гормонов, геномное и негеномное влияние на ЦНС которых обусловлено их взаимодействием с эстрогеновыми рецепторами *ER α* и *ER β* , кодируемыми генами *ESR1* и *ESR2* соответственно. Большинство ассоциативных исследований этих генов сосредоточено на изучении четырех полиморфных локусов – *rs2234693* ($-397T > C$) и *rs9340799* ($-351A > G$) в гене *ESR1*, а также *rs1256049* ($1082G > A$) и *rs4986938* ($1730G > A$) в гене *ESR2*, которые, как предполагается, оказывают влияние на экспрессию гена и ассоциированы с ДР (Keyes et al., 2015).

Андрогены – мужские половые гормоны, также участвующие в регуляции активности ЦНС. Основной андроген – тестостерон – выполняет ряд физиологических функций, среди которых известна регуляция психоэмоциональной сферы у мужчин. Отмечается, что снижение уровня тестостерона, в том числе по причине возрастной андропавы, значительно повышает риск развития ДР (Древал, 2017). Кроме того, снижение экспрессии гена андрогенового рецептора *AR* (Xq12), обусловленное наличием протяженных полиглутаминовых участков [CAG]_n

в 1-м экзоне, коррелировало с повышенным риском развития депрессии (Sankar, Hampson, 2012). Однако в других работах этой ассоциации не обнаружено (Gardiner et al., 2017).

Роль генов медиаторов воспаления. В последние годы активно развивается гипотеза о наличии воспалительного процесса в организме как предиктора ДР, о чем свидетельствуют данные о повышенной экспрессии воспалительных медиаторов, в частности С-реактивного белка острой фазы воспаления CRP (ген *CRP*), фактора некроза опухоли альфа (*TNF*), интерлейкина-1 β (*IL1B*) и интерлейкина-6 (*IL6*) (Liu et al., 2012; Köhler et al., 2017) у пациентов с депрессивным эпизодом. Это объясняется тем, что стресс любого происхождения, которому подвергаются индивиды, сопровождается ростом концентрации цитокинов в крови и повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Подобные изменения приводят к способности циркулирующих в крови цитокинов проникать в мозг, запускать нейровоспалительные реакции, что может способствовать развитию ДР и других психопатологий. Вместе с тем существуют убедительные доказательства того, что под воздействием воспалительных медиаторов значительно снижается синаптическая доступность моноаминов, что, как известно, является одним из основных механизмов в этиопатогенезе ДР (Miller, Raison, 2016).

При изучении воспалительной теории депрессии рассматриваются также дисфункция Т-клеток и нарушения иммунного ответа. Так, в исследовании M.L. Wong с коллегами (2008) было установлено, что 47.8 % популяционного риска развития депрессии обусловлено генетическими вариациями в гене *PSMB4* (*rs2296840*), который кодирует β 4-субъединицу протеасом, а также в гене транскрипционного фактора *TBX21* (*rs17244587*), участвующем в дифференцировке Т-лимфоцитов. Кроме того, с функционированием Т-клеток и ответом на терапию антидепрессантами была значительно связана активность генов ϵ -субъединицы корцептора Т-лимфоцитов *CD3E*, β -субъединицы глюкозидазы II *PRKCSH*, сигнального белка *STAT3* и белка протеасомы *PSMD9* (Wong et al., 2008). Это позволяет рассматривать их в качестве кандидатов при исследовании ДР.

Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS)

На этом этапе развития психогенетики одним из наиболее перспективных методов изучения сложных поведенческих признаков является метод полногеномного анализа ассоциаций (Genome-Wide Association Study, GWAS), в котором исследованию подвергаются тысячи однонуклеотидных замен, в том числе в генах, вовлеченных в еще неизвестные патогенетические механизмы, приводящие к манифестации ДР. Одно из первых GWAS исследований продемонстрировало ассоциацию локуса *rs2522833* в гене *PCLO* ($p = 6.4 \times 10^{-8}$) с риском развития ДР, однако не достигшую уровня статистической значимости для GWAS работ ($p < 5 \times 10^{-8}$) (Sullivan et al., 2009). Последующее исследование подтвердило участие данного белка в регуляции ДР, показав ассоциацию с локусом *rs2715157* ($p = 2.91 \times 10^{-8}$) в гене *PCLO* (Mbarek et al., 2017). Известно, что ген *PCLO* кодирует белок, который локализуется

в пресинаптических областях и играет важную роль в моноаминергической нейротрансмиссии мозга (Sullivan et al., 2009), что укладывается в современные представления о нейромедиаторной теории возникновения депрессии.

В рамках психиатрического консорциума PGC-MDD (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium) в 2013 г. было обнаружено 15 полиморфных локусов в генах региона 3p21.1 и ассоциированных с комбинированным фенотипом: ген *PBRM1*, участвующий в ремоделировании хроматина; ген фактора пролиферации стволовых клеток (*GNL3*), ген гликозилтрансферазы-8 (*GLT8D1*), кластер генов *ITIH1-ITIH3-ITIH4* и др. (Major Depressive Disorder Working Group..., 2013). Наиболее значимая ассоциация была выявлена с *rs2535629* ($p = 5.9 \times 10^{-9}$) в районе гена α -трипсина ингибитора *ITIH3*, вовлеченность которого в регуляцию ДР требует проведения дополнительных исследований.

По данным ряда полногеномных исследований, проведенных позже, была обнаружена ассоциация нескольких полиморфных локусов генов, участвующих в регуляции циркадных ритмов: гена сиртуина (*SIRT1*), гена мелатонинового рецептора (*MTNR1A*), гена ломкой гистидиновой триады или опухолевого супрессора (*FHIT*) (CONVERGE consortium, 2015; Demirkan et al., 2016; Direk et al., 2017). Результаты свидетельствуют о том, что циркадные ритмы оказывают значительное влияние на регуляцию психоэмоциональной сферы индивида и указывают на важность рассмотрения этой компоненты для понимания биологических механизмов, лежащих в основе развития депрессии.

При изучении риска развития ДР с использованием полногеномного анализа на объединенной выборке из когорт CONVERGE, PGC и 23andMe наиболее сильные сигналы для ДР были выявлены с локусами *rs7973260* ($p = 1.8 \times 10^{-9}$) и *rs62100776* ($p = 8.5 \times 10^{-9}$) в генах *KSR2* (12q24.22-q24.23) и *DCC* (18q21.2) соответственно (Okbay et al., 2016) и с *rs9540720* в гене *PCDH9* ($p = 1.69 \times 10^{-8}$). Примечательно, что продукты гена протокадгерина (*PCDH9*) и киназного супрессора (*KSR2*), взаимодействующего с нетрином-1 (*DCC*), участвуют в синаптической пластичности, клеточной адгезии и процессах аксонального наведения (axon guidance) (Guo et al., 2016; Xiao et al., 2018). Кроме того, повышенная экспрессия гена *DCC* в области префронтальной коры вызывает восприимчивость к депрессивно-подобному поведению у мышей (Torres-Berrío et al., 2017), а гена *PCDH9* – в гиппокампе и лобной доле у депрессивных пациентов, что может служить маркером риска развития ДР у человека (Xiao et al., 2018).

Полногеномное исследование D.M. Howard с коллегами (2018) с участием когорты UK Biobank продемонстрировало ассоциацию 17 полиморфных локусов с развитием различных фенотипов депрессии: *rs10127497* (ген *SGIP1*), *rs6424532* (*LOC105378800*), *rs7548151* (*ASTN1*), *rs6699744* (*LOC105378797*), *rs112348907* (*KCNQ5*), *rs3132685* (*HCG9*), *rs5011432* (*TMEM106B*), *rs2402273*, *rs1554505* (*MAD1L1*), *rs3807865* (*TMEM106B*), *rs263575* (*LOC105375983*), *rs10929355* (*NBAS*), *rs40465* (*LOC105379109*), *rs1021363* (*SORCS3*), *rs10501696*

(*GRM5*), *rs9530139 (B3GLCT)* и *rs28541419*. Отмечается, что эти гены могут быть вовлечены в процессы синаптической передачи и нейрогенеза (Howard et al., 2018). Участие еще одного гена (*AUTS2*), связанного с нейрогенезом, в развитии ДР было обнаружено в GWAS-исследовании, основанном на изучении локусов, ассоциированных с эффективным ответом на терапию антидепрессантами (*rs7785360* и *rs12698828*, $p = 1.60 \times 10^{-8}$) (Myung et al., 2015).

Таким образом, полученные в ходе полногеномных анализов ассоциаций данные свидетельствуют о том, что в развитие ДР вовлечено множество генов (в том числе ранее неисследованных при психопатологических состояниях), участвующих в различных этапах нейрогенеза, синаптической пластичности и регуляции циркадных ритмов. Это согласуется с существующей теорией о полигенной генетической архитектуре ДР и указывает направление для проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований в этой области.

Полноэкзомное секвенирование (WES)

С развитием технологий NGS-секвенирования (Next Generation Sequencing) наметилась тенденция к секвенированию областей, содержащих только кодирующие участки генов – экзоны. Суммарная протяженность экзонов, как известно, составляет около 1 % генома, однако полагается, что подавляющее число патогенных мутаций затрагивает именно эти последовательности. Исходя из этого, полноэкзомное секвенирование (Whole Exome Sequencing, WES) представляется одним из актуальных подходов для решения ряда диагностических и исследовательских задач.

В настоящее время проведено несколько полноэкзомных исследований по изучению ДР. Первое полноэкзомное секвенирование по фармакогенетике антидепрессантов (Tammiste et al., 2013) было осуществлено группой ученых из Тартуского университета ($n = 510$). Tammiste с коллегами установили, что *rs41271330* в гене костного морфогенетического белка (*BMP5*) ассоциирован с ответом на терапию антидепрессантами. В ходе другого WES-исследования, проведенного в рамках RS (Rotterdam Study) и ERF (Erasmus Rucphen Family), была обнаружена миссенс-мутация *rs77960347 (Asn396Ser)* в гене эндотелиальной липазы *LIPG*, которая встречается с частотой в 1 % в общей популяции и ассоциирована с депрессивными симптомами ($p = 5.2 \times 10^{-8}$) (Amin et al., 2017b). Предполагается, что этот фермент участвует в метаболизме стероидов, холестерина и гормонов щитовидной железы, а замена *Asn396Ser* приводит к снижению его эффективности (Amin et al., 2017b). Кроме того, этой же группой ученых в ходе дальнейшего WES-анализа у пациентов с ДР была обнаружена мутация в гене *NKPD1* ($p = 3.7 \times 10^{-8}$), участвующем в синтезе сфинголипидов (Amin et al., 2017a), и в гене *RCL1* ($p = 1.0 \times 10^{-4}$) (Amin et al., 2018). Как известно, сфинголипиды широко представлены в нервной ткани и участвуют в процессе миелинизации, снижение эффективности которого может приводить к дегенерации нейронов. В то же время ген *RCL1* широко экспрессируется в астроцитах и нейронах коры больших полушарий, однако его влияние на их функцию, а также потенциальная связь с патогенезом ДР еще не до

конца ясны и требуют проведения ряда дополнительных исследований.

Заключение

Многочисленные результаты полногеномных и полноэкзомных анализов, обобщенные в настоящем обзоре, сходятся в том, что ключевыми процессами, задействованными в формировании ДР, являются процессы нейрогенеза, клеточной адгезии, аксонального наведения и синаптической пластичности, изменения в которых традиционно рассматривались в контексте основных причин развития когнитивных нарушений и нейродегенеративных расстройств. Кроме того, интересными представляются данные об ассоциации генов, продукты которых вовлечены в регуляцию циркадных ритмов, воспаление и гормональную регуляцию с риском развития депрессии. Это свидетельствует о том, что патогенез ДР – весьма сложный процесс, затрагивающий нарушения в целом каскаде реакций и работе генов, каждый из которых приносит лишь небольшой вклад в развитие депрессии.

Предполагается, что значительный вклад в понимание природы ДР могут внести исследования эпигенетических факторов, таких как метилирование и модификации гистонов, микроРНК и длинные некодирующие РНК, подробно изученные в работе (Мустафин и др., 2018). Не исключается и влияние генно-средовых взаимодействий, этногеографических и социокультурных факторов на степень проявления депрессивной симптоматики посредством эпигенетической регуляции работы генов, представляющей особый интерес в дальнейших исследованиях в этой области.

Список литературы / References

- Древал А.В. Изменение функционирования репродуктивной системы мужчин с возрастом. РМЖ: Эндокринология. 2017; 25(22):1661-1664.
- [Dreval A.V. Age changes in the functioning of the reproductive system of men. RMJ: Endocrinologiya = Russian Medical Journal: Endocrinology. 2017;25(22):1661-1664. (in Russian)]
- Казанцева А.В., Кутлумбетова Ю.Ю., Малых С.Б., Лобаскова М.М., Хуснутдинова Э.К. Ассоциация полиморфных маркеров генов аргинин-вазопрессиновых рецепторов (AVPR1A, AVPR1B) с чертами личности. Генетика. 2014;50(3):341-352. DOI 10.7868/S0016675814030047.
- [Kazantseva A.V., Kutlumbetova Y.Y., Malykh S.B., Lobaskova M.M., Khusnutdinova E.K. Arginine-vasopressin receptor gene (AVPR1A, AVPR1B) polymorphisms and their relation to personality traits. Russ. J. Genet. 2014;50(3):298-307. DOI 10.1134/S1022795414030041.]
- МКБ-10: Международная классификация болезней 10-го пересмотра, версия 2018. available at: <http://mkb-10.com/>.
- [ICD-10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, version 2018. Available at: <http://mkb-10.com/>. (in Russian)]
- Мустафин Р.Н., Еникеева Р.Ф., Давыдова Ю.Д., Хуснутдинова Э.К. Роль эпигенетических факторов в развитии депрессивных расстройств. Генетика. 2018;54(12):1376-1389. DOI 10.1134/S001667581812010X.
- [Mustafin R.N., Enikeeva R.F., Davydova Y.D., Khusnutdinova E.K. The role of epigenetic factors in the development of depressive disorders. Russ. J. Genet. 2018;54(12):1397-1409. DOI 10.1134/S1022795418120104.]
- Смулевич А.Б. Депрессии при психических и соматических заболеваниях. М., Медицинское информационное агентство, 2015.

- [Smulevich A.B. Depression in Psychiatric and Medical Practices. Moscow: Medical Information Agency Publ., 2015. (in Russian)]
- Янкина М.А., Сайк О.В., Иванисенко В.А., Деменков П.С., Хуснутдинова Э.К. Оценка методов приоритизации генов внешнего пути апоптоза в качестве кандидатов, ассоциированных с большим депрессивным расстройством. *Генетика*. 2018;54(11):1338-1348. DOI 10.1134/S0016675818110176.
- [Yankina M.A., Saik O.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Khusnutdinova E.K. Evaluation of prioritization methods of extrinsic apoptotic signaling pathway genes for retrieval of the new candidates associated with major depressive disorder. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2018;54(11):1338-1348. DOI 10.1134/S0016675818110176. (in Russian)]
- Amin N., Belonogova N.M., Jovanova O., Brouwer R.W.W., van Rooij J.G.J., van den Hout M.C.G.N., Svishcheva G.R., Kraaij R., Zorkoltseva I.V., Kirichenko A.V., Hofman A., Uitterlinden A.G., van IJcken W.F.J., Tiemeier H., Axenovich T.I., van Duijn C.M. Nonsynonymous variation in NKPD1 increases depressive symptoms in European populations. *Biol. Psychiatry*. 2017a;81(8):702-707. DOI 10.1016/j.biopsych.2016.08.008.
- Amin N., Jovanova O., Adams H.H., Dehghan A., Kavousi M., Verhoef M.W., Peeters R.P., de Vrij F.M.S., van der Lee S.J., van Rooij J.G.J., van Leeuwen E.M., Chaker L., Demirkan A., Hofman A., Brouwer R.W.W., Kraaij R., van Dijk K.W., Hankemeier T., van IJcken W.F.J., Uitterlinden A.G., Niessen W.J., Franco O.H., Kushner S.A., Ikram M.A., Tiemeier H., van Duijn C.M. Exome-sequencing in a large population-based study reveals a rare Asn396Ser variant in the LIPG gene associated with depressive symptoms. *Mol. Psychiatry*. 2017b;22(4):537-543. DOI 10.1038/mp.2016.101.
- Amin N., de Vrij F.M.S., Baghdadli M., Brouwer R.W.W., van Rooij J.G.J., Jovanova O., Uitterlinden A.G., Hofman A., Jansen H.L.A., Darwish Murad S., Kraaij R., Stedehouder J., van den Hout M.C.G.N., Kros J.M., van IJcken W.F.J., Tiemeier H., Kushner S.A.C., van Duijn M. A rare missense variant in RCL1 segregates with depression in extended families. *Mol. Psychiatry*. 2018;23(5):1120-1126. DOI 10.1038/mp.2017.49.
- Bachis A., Cruz M.I., Nosheny R.L., Mocchetti I. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci. Lett*. 2008;442(2):104-108. DOI 10.1016/j.neulet.2008.06.081.
- Bîlc M.I., Vultur R., Chiş A., Buciuman M., Nuţu D., Bunea I., Szentágotai-Tátrai A., Miu A.C. Childhood trauma and emotion regulation: The moderator role of BDNF Val66Met. *Neurosci. Lett*. 2018;685:7-11. DOI 10.1016/j.neulet.2018.07.018.
- Bleys D., Luyten P., Soenens B., Claes S. Gene-environment interactions between stress and 5-HTTLPR in depression: A meta-analytic update. *J. Affect. Disord*. 2018;226:339-345. DOI 10.1016/j.jad.2017.09.050.
- CONVERGE consortium. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature*. 2015;523(7562):588-591. DOI 10.1038/nature14659.
- Culverhouse R.C., Saccone N.L., Horton A.C., ..., Weinstein M., Whoolsey M., Nurnberger J.I.Jr. Collaborative meta-analysis finds no evidence of a strong interaction between stress and 5-HTTLPR genotype contributing to the development of depression. *Mol. Psychiatry*. 2018;23(1):133-142. DOI 10.1038/mp.2017.44.
- Cusin C., Yang H., Yeung A., Fava M. Rating scales for depression. Eds. L. Baer, M.A. Blais. *Handbook of Clinical Rating Scales and Assessment in Psychiatry and Mental Health*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2010;7-35.
- Daches S., Vine V., Layendecker K.M., George C.J., Kovacs M. Family functioning as perceived by parents and young offspring at high and low risk for depression. *J. Affect. Disord*. 2018;226:355-360. DOI 10.1016/j.jad.2017.09.031.
- Demirkan A., Lahti J., Direk N., ..., Tiemeier H., van Duijn C.M., Räikkönen K. Somatic, positive and negative domains of the Center for Epidemiological Studies Depression (CES-D) scale: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Psychol. Med*. 2016;6(8):1613-1623. DOI 10.1017/S0033291715002081.
- Direk N., Williams S., Smith J.A., ..., Zhao W., Tiemeier H., Sullivan P.F. An analysis of two genome-wide association meta-analyses identifies a new locus for broad depression phenotype. *Biol. Psychiatry*. 2017;82(5):322-329. DOI 10.1016/j.biopsych.2016.11.013.
- Fitzgerald P.B., Laird A.R., Maller J., Daskalakis Z.J. A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Hum. Brain Mapp*. 2008;29(6):683-695. DOI 10.1002/hbm.20426.
- Gardiner S.L., van Belzen M.J., Boogaard M.W., van Roon-Mom W.M.C., Rozing M.P., van Hemert A.M., Smit J.H., Beekman A.T.F., van Grootheest G., Schoevers R.A., Oude Voshaar R.C., Comijs H.C., Penninx B.W.J.H., van der Mast R.C., Roos R.A.C., Aziz N.A. Large normal-range TBP and ATXN7 CAG repeat lengths are associated with increased lifetime risk of depression. *Transl. Psychiatry*. 2017;7(6):e1143. DOI 10.1038/tp.2017.116.
- Gatt J.M., Burton K.L., Williams L.M., Schofield P.R. Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *J. Psychiatr. Res*. 2015;60:1-13. DOI 10.1016/j.jpsychires.2014.09.014.
- Gerhard D.M., Duman R.S. Sex-specific molecular changes in depression. *Biol. Psychiatry*. 2018;84(1):2-4. DOI 10.1016/j.biopsych.2018.05.005.
- Girgus J.S., Yang K. Gender and depression. *Curr. Opin. Psychol*. 2015;4:53-60. DOI 10.1016/j.copsyc.2015.01.019.
- Guo L., Costanzo-Garvey D.L., Smith D.R., Neilsen B.K., MacDonald R.G., Lewis R.E. Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2) expression in the brain regulates energy balance and glucose homeostasis. *Mol. Metab*. 2016;6(2):194-205. DOI 10.1016/j.molmet.2016.12.004.
- Hajek T., Kozeny J., Kopecek M., Alda M., Höschl C. Reduced subgenual cingulate volumes in mood disorders: a meta-analysis. *J. Psychiatry Neurosci*. 2008;33:91-99.
- Howard D.M., Adams M.J., Shirali M., ... Breen G., Deary I.J., McIntosh A.M. Genome-wide association study of depression phenotypes in UK Biobank identifies variants in excitatory synaptic pathways. *Nat. Commun*. 2018;9:1470. DOI 10.1038/s41467-018-03819-3.
- Jiang P., Dang R.-L., Li H.-D., Zhang L.H., Zhu W.Y., Xue Y., Tang M.M. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2014;729827. DOI 10.1155/2014/729827.
- Kazantseva A., Gaysina D., Kutlumbetova Y., Kanzaforova R., Malykh S., Lobaskova M., Khusnutdinova E. Brain derived neurotrophic factor gene (BDNF) and personality traits: the modifying effect of season of birth and sex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2015;56:58-65. DOI 10.1016/j.pnpbp.2014.08.001.
- Kendler K.S., Gatz M., Gardner C.O., Pedersen N.L. A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am. J. Psychiatry*. 2006;163(1):109-114. DOI 10.1176/appi.ajp.163.1.109.
- Keyes K., Agnew-Blais J., Roberts A.L., Hamilton A., de Vivo I., Ranu H., Koenen K. The role of allelic variation in estrogen receptor genes and major depression in the Nurses Health Study. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol*. 2015;50(12):1893-1904. DOI 10.1007/s00127-015-1087-1.
- Kim M., Kim Y.-S., Kim D.-H., Yang T.W., Kwon O.Y. Major depressive disorder in epilepsy clinics: A meta-analysis. *Epilepsy Behav*. 2018;84:56-69. DOI 10.1016/j.yebeh.2018.04.015.
- Kishi T., Yoshimura R., Fukuo Y., Okochi T., Matsunaga S., Umene-Nakano W., Nakamura J., Serretti A., Correll C.U., Kane J.M., Iwata N. The serotonin 1A receptor gene confer susceptibility to mood disorders: results from an extended meta-analysis of patients with major depression and bipolar disorder. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*. 2013;263(2):105-118. DOI 10.1007/s00406-012-0337-4.
- Koolschijn P.C., van Haren N.E., Lensvelt-Mulders G.J., Hulshoff Pol H.E., Kahn R.S. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum. Brain Mapp*. 2009;30(11):3719-3735. DOI 10.1002/hbm.20801.
- Köhler C.A., Freitas T.H., Maes M., de Andrade N.Q., Liu C.S., Fernandes B.S., Stubbs B., Solmi M., Veronese N., Herrmann N., Raison C.L., Miller B.J., Lanctôt K.L., Carvalho A.F. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatr. Scand*. 2017;135(5):373-387. DOI 10.1111/acps.12698.

- Kushner S.C., Herzhoff K., Vrshek-Schallhorn S., Tackett J.L. Depression in early adolescence: Contributions from relational aggression and variation in the oxytocin receptor gene. *Aggress. Behav.* 2018;44(1):60-68. DOI 10.1002/ab.21724.
- Liu Y., Ho R.C., Mak A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *J. Affect. Disord.* 2012;139(3):230-239. DOI 10.1016/j.jad.2011.08.003.
- Liu Z., Huang L., Luo X.J., Wu L., Li M. MAOA Variants and genetic susceptibility to major psychiatric disorders. *Mol. Neurobiol.* 2016;53(7):4319-4327. DOI 10.1007/s12035-015-9374-0.
- Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol. Psychiatry.* 2013;18(4):497-511. DOI 10.1038/mp.2012.21.
- Mbarek H., Milaneschi Y., Hottenga J.J., Ligthart L., de Geus E.J.C., Ehli E.A., Willemsen G., Davies G.E., Smit J.H., Boomsma D.I., Penninx B.W.J.H. Genome-wide significance for PCLO as a gene for major depressive disorder. *Twin Res. Hum. Genet.* 2017;20(4):267-270. DOI 10.1017/thg.2017.30.
- Miller A.H., Raison C.L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16(1):22-34. DOI 10.1038/nri.2015.5.
- Myung W., Kim J., Lim S.-W., Shim S., Won H.-H., Kim S., Kim S., Lee M.-S., Chang H.-S., Kim J.-W., Carroll B.J., Kim D.K. A genome-wide association study of antidepressant response in Koreans. *Transl. Psychiatry.* 2015;5:e633. DOI 10.1038/tp.2015.127.
- Naughton M., Dinan T.G., Scott L.V. Corticotropin-releasing hormone and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in psychiatric disease. *Handb. Clin. Neurool.* 2014;124:69-91. DOI 10.1016/B978-0-444-59602-4.00005-8.
- Neumann I.D., Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends Neurosci.* 2012;35(11):649-659. DOI 10.1016/j.tins.2012.08.004.
- Okbay A., Baselmans B.M., de Neve J.E., ..., Benjamin D.J., Bartels M., Cesarini D. Genetic variants associated with subjective well-being, depressive symptoms, and neuroticism identified through genome-wide analyses. *Nat. Genet.* 2016;48(6):624-633. DOI 10.1038/ng.3552.
- Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry (Moscow).* 2017;82(3):308-317. DOI 10.1134/S0006297917030099.
- Rai V. Association of C677T polymorphism (rs1801133) in MTHFR gene with depression. *Cell. Mol. Biol.* 2017;63(6):60-67. DOI 10.14715/cmb/2017.63.6.13.
- Rui H., Qian H., Shi M., Zhang G., Wang L. Meta-analysis on the association between norepinephrine transporter gene rs2242446, rs5569 polymorphisms and risk of major depressive disorder. *Arch. Med. Res.* 2018;49(4):261-269. DOI 10.1016/j.arcmed.2018.08.010.
- Sahu A., Gupta P., Chatterjee B. Depression is more than just sadness: a case of excessive anger and its management in depression. *Indian J. Psychol. Med.* 2014;36(1):77-79. DOI 10.4103/0253-7176.127259.
- Sankar J.S., Hampson E. Testosterone levels and androgen receptor gene polymorphism predict specific symptoms of depression in young men. *Gend. Med.* 2012;9(4):232-243. DOI 10.1016/j.genm.2012.05.001.
- Shadrina M., Bondarenko E.A., Slominsky P.A. Genetics factors in major depression disease. *Front. Psychiatry.* 2018;9:334. DOI 10.3389/fpsyt.2018.00334.
- Sullivan P.F., de Geus E.J., Willemsen G., ..., Wray N.R., Boomsma D.I., Penninx B.W. Genome-wide association for major depressive disorder: a possible role for the presynaptic protein piccolo. *Mol. Psychiatry.* 2009;14(4):359-375. DOI 10.1038/mp.2008.125.
- Tammiste A., Jiang T., Fischer K., Mägi R., Krjutškov K., Pettai K., Esko T., Li Y., Tansey K.E., Carroll L.S., Uher R., McGuffin P., Vösa U., Tšernikova N., Saria A., Ng P.C., Eller T., Vasar V., Nutt D.J., Maron E., Wang J., Metspalu A. Whole-exome sequencing identifies a polymorphism in the BMP5 gene associated with SSRI treatment response in major depression. *J. Psychopharmacol.* 2013;27(10):915-920. DOI 10.1177/0269881113499829.
- Taylor S. Association between COMT Val158Met and psychiatric disorders: A comprehensive meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. B. Neuro-psychiatr. Genet.* 2018;177(2):199-210. DOI 10.1002/ajmg.b.32556.
- Torres-Berrio A., Lopez J.P., Bagot R.C., Nouel D., Bo G.D., Cuesta S., Zhu L., Manitt C., Eng C., Cooper H.M., Storch K.-F., Turecki G., Nestler E.J., Flores C. DCC confers susceptibility to depression-like behaviors in humans and mice and is regulated by miR-218. *Biol. Psychiatry.* 2017;81(4):306-315. DOI 10.1016/j.biopsych.2016.08.017.
- Wang M., Ma Y., Yuan W., Su K., Li M.D. Meta-analysis of the COMT Val158Met polymorphism in major depressive disorder: effect of ethnicity. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2016;11(3):434-445. DOI 10.1007/s11481-016-9651-3.
- Wang S.S., Kamphuis W., Huitinga I., Zhou J.N., Swaab D.F. Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. *Mol. Psychiatry.* 2008;13(8):786-799. DOI 10.1038/mp.2008.38.
- Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 1998;64(3):169-172. DOI 10.1006/mgme.1998.2714.
- WHO: Depression and Other Common Mental Disorders. Global Health Estimates. 2017. available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>.
- Wong M.L., Dong C., Maestre-Mesa J., Licinio J. Polymorphisms in inflammation-related genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant response. *Mol. Psychiatry.* 2008;13(8):800-812. DOI 10.1038/mp.2008.59.
- Xiao X., Zheng F., Chang H., Ma Y., Yao Y.G., Luo X.J., Li M. The gene encoding protocadherin 9 (PCDH9), a novel risk factor for major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43(5):1128-1137. DOI 10.1038/npp.2017.241.
- Youssef M.M., Underwood M.D., Huang Y.Y., Hsiung S., Liu Y., Simpson N.R., Bakalian M.J., Rosoklija G.B., Dwork A.J., Arango V., Mann J.J. Association of BDNF Val66Met polymorphism and brain BDNF levels with major depression and suicide. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2018;21(6):528-538. DOI 10.1093/ijnp/pyy008.
- Zhao X., Sun L., Sun Y.H., Ren C., Chen J., Wu Z.Q., Jiang Y.H., Lv X.L. Association of HTR2A T102C and A-1438G polymorphisms with susceptibility to major depressive disorder: a meta-analysis. *Neurol. Sci.* 2014;35(12):1857-1866. DOI 10.1007/s10072-014-1970-7.

ORCID ID

Yu.D. Davydova orcid.org/0000-0003-3508-4710
R.F. Enikeeva orcid.org/0000-0002-4301-5283
A.V. Kazantseva orcid.org/0000-0002-3744-8058

R.N. Mustafin orcid.org/0000-0002-4091-382X
S.B. Malykh orcid.org/0000-0002-3786-7447
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-офи-м «Геномика агрессивного и депрессивного поведения человека» № 17-29-02195.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.12.2018. После доработки 18.02.2019. Принята к публикации 09.03.2019.

Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions

A.N. Shuvaev¹✉, O.S. Belozor¹, M.V. Smolnikova^{1, 4}, D.A. Yakovleva², Andr.N. Shuvaev², O.M. Kazantseva³, E.A. Pozhilenkova¹, O.I. Mozhej⁵, S. Kasparov^{5, 6}

¹ Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voino-Yasenetsky, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk, Russia

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

³ Krasnoyarsk State Center of Medical Genetics, Krasnoyarsk, Russia

⁴ Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia

⁵ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

⁶ University of Bristol, Bristol, United Kingdom

✉ e-mail: shuvaevanton2016@gmail.com

Hereditary disorders of the neuronal system are some of the most important problems of medicine in the XXI century. The most interesting representatives of this group are highly prevalent polyglutamine spinocerebellar ataxias (SCAs). It has a basement for quick progression of expansion among different groups all over the World. These diseases are SCA1, 2, 3, 6, 7 and 17, which phenotypically belong to one group due to similarities in clinics and genetics. The substrate of these genetic conditions is CAG trinucleotide repeat of Ataxin genes which may expand in the course of reproduction. For this reason a characteristic feature of these diseases is not only an increase in patient numbers, but also a qualitative change in the progression of their neurological symptoms. All these aspects are reflected in the structure of the incidence of polyglutamine SCAs, both at the global level and at the level of individual population groups. However, most scientific reports that describe the population genetics of polyglutamine SCAs are limited to quantitative indicators of a specific condition in a certain area, while the history of the occurrence and principles of the distribution of polyglutamine SCAs are poorly understood. This prevents long-term predictions of the dynamics of the disease and development of strategies for controlling the spread of mutations in the populations. In this paper we make a detailed analysis of the polyglutamine SCAs population genetics, both in the whole world and specifically in the Russian Federation. We note that for a better analysis it would be necessary to cover a wider range of populations in Africa, Asia and South America, which will be possible with the development of new methods for molecular genetics. Development of new methods of detection of polyglutamine SCAs will allow the scientists to better understand how they lead to the brain disease, the means of their spread in the population and to develop better methods for therapy and prevention of these diseases.

Key words: spinocerebellar ataxia; polyglutamine diseases; population genetics; epidemiology.

For citation: Shuvaev A.N., Belozor O.S., Smolnikova M.V., Yakovleva D.A., Shuvaev Andr.N., Kazantseva O.M., Pozhilenkova E.A., Mozhej O.I., Kasparov S. Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):473-481. DOI 10.18699/VJ19.516

Популяционная генетика полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксий

А.Н. Шуваев¹✉, О.С. Белозор¹, М.В. Смольникова^{1, 4}, Д.А. Яковлева², Андр.Н. Шуваев², О.М. Казанцева³, Е.А. Пожиленкова¹, О.И. Можей⁵, С. Каспаров^{5, 6}

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

³ Красноярский краевой медико-генетический центр, Красноярск, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия

⁵ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

⁶ Университет Бристоль, Бристоль, Великобритания

✉ e-mail: shuvaevanton2016@gmail.com

Наследственные заболевания нервной системы – одна из наиболее актуальных проблем медицины XXI века. Особо выделяются те, которые доминируют в этой группе. К таким заболеваниям, безусловно, можно отнести полиглутаминовые спиноцереbellарные атаксии (СЦА), имеющие в своей основе молекулярные механизмы быстро прогрессирующей экспансии среди различных групп населения нашей планеты. Это СЦА1, 2, 3, 6, 7 и 17, фенотипически объединенные в одну группу по принципу развития мозжечковой атаксии вследствие специфических генетических причин. Субстратом данных генетических заболеваний является ЦАГ тринуклеотидная

последовательность (цитозин-аденин-гуанин), которая имеет тенденцию к увеличению при передаче генома последующим поколениям. Поэтому характерная особенность этих заболеваний – не только количественное увеличение больных, но и качественное изменение течения их неврологической симптоматики. Все это отражается в структуре заболеваемости полиглутаминовыми СЦА как на глобальном общемировом уровне, так и на уровне отдельных групп населения конкретных регионов. Однако большинство работ, посвященных популяционной генетике полиглутаминовых СЦА, ограничиваются количественными показателями конкретной нозологии на определенной территории, тогда как история возникновения и принципы распространения полиглутаминовых СЦА на сегодняшний день исследованы недостаточно хорошо. Это не позволяет делать долгосрочные прогнозы относительно динамики в последующих поколениях и управлять мутагенным процессом. В настоящей работе представлен детальный анализ популяционной генетики полиглутаминовых СЦА, выведены общие генетические и частные закономерности их развития и особенности популяционной динамики в мире и в Российской Федерации. Обозначены проблемы в исследовании и выявлении таких заболеваний. Для лучшего понимания необходимо охватить широкий пласт популяций Африки, Азии и Южной Америки, что будет возможно при развитии новых методов молекулярной генетики. Такой подход к исследованию полиглутаминовых СЦА позволяет обозначить их место в контексте генетических заболеваний головного мозга и определить особенности распространения и методов генетической профилактики.

Ключевые слова: спиноцереbellарная атаксия; полиглутаминовые заболевания; популяционная генетика; эпидемиология.

Introduction

In 1991 a new type of mutations in the human genome was discovered, the so-called “dynamic mutations”. These mutations cause an increase in the number of copies (expansion) of the simple repeating sequences (Kremer et al., 1991; Warren 1996). As was revealed later, there are numerous simple (CAG, GCG, GCC, GAA, CTG) (Verkerk et al., 1991; Brook et al., 1992; Matilla et al., 1993; Kawaguchi et al., 1994; Koide et al., 1994; Gedeon et al., 1995; Campuzano et al., 1996; David et al., 1997; Zhuchenko et al., 1997; Babovic-Vuksanovic et al., 1998; Brais et al., 1998; Xiang et al., 1998; Vincent et al., 2000; O’Hearn et al., 2001), and more complex repetitive sequences (CTGG, ATTCT, CCCC GCCCGCG) (Laloti et al., 1997; Liquori et al., 2001; Potaman et al., 2003). The most common and heterogeneous group of such diseases is the group caused by expansion of CAG triplet in relevant genes (Table 1). CAG encodes the amino acid glutamine, so these diseases are called “polyglutamine” (Zoghby, Orr, 1999).

Today, we know of at list nine such conditions. The first one, which was described in 1991, linked to CAG expansion and causing the progressing degeneration of motor neurons, was the spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), or Kennedy’s disease (La Spada et al., 1991). Subsequently also this pathological mechanism has been found in eight other diseases, including Huntington’s disease (HD) in the huntingtin gene, dentato-rubral-pallido-luysian atrophy (DRPLA or Haw River syndrome) in the *ATN1* gene, and six types of spinocerebellar ataxias (SCA1, 2, 3, 6, 7, and 17) (Gardian et al., 2005).

Among all polyglutamine diseases there, SCAs have the most similar pathophysiology, progression and clinical signs. Their genetics, however, is not identical (see Table 1).

Features of mutagenesis in polyglutamine SCA progression

Mechanisms of mutagenic process are dramatically different from those of the static mutations. This explains the dominance of polyglutamine SCAs over SCAs caused by static mutations. In comparison to point mutations, which occur spontaneously and stochastically, dynamic mutations have a substrate, the CAG sequence, which initially is repeated only several times (Dunnen, 2017). CAG sequence expansion usually takes place during mitosis of somatic and germ cells. Trinucleotide

repeat expansion occurs by replication-dependent (Kovtun, McMurray, 2001), and reparation-dependent (Kovtun et al., 2007) mechanisms. These disturbances are the cause of the phenomenon called “anticipation”, when the disease occurs progressively earlier and is more severe in subsequent generations. It was discovered that, the longer the allele is, the more unstable it becomes. The average number of CAG repeats expanded during reproduction depends on the SCA type (from +0.5 CAG repeats in SCA3 to +12 CAG repeats in SCA7) (Stevanin et al., 2000). Paternal alleles are more unstable during transmission which is probably due to a larger number of mitotic divisions during sperm cell maturation compared to oocytes during gametogenesis. However, it could also be linked with decreases in repair DNA protein concentration and activity (Pearson et al., 2005).

The prevalence of polyglutamine SCAs

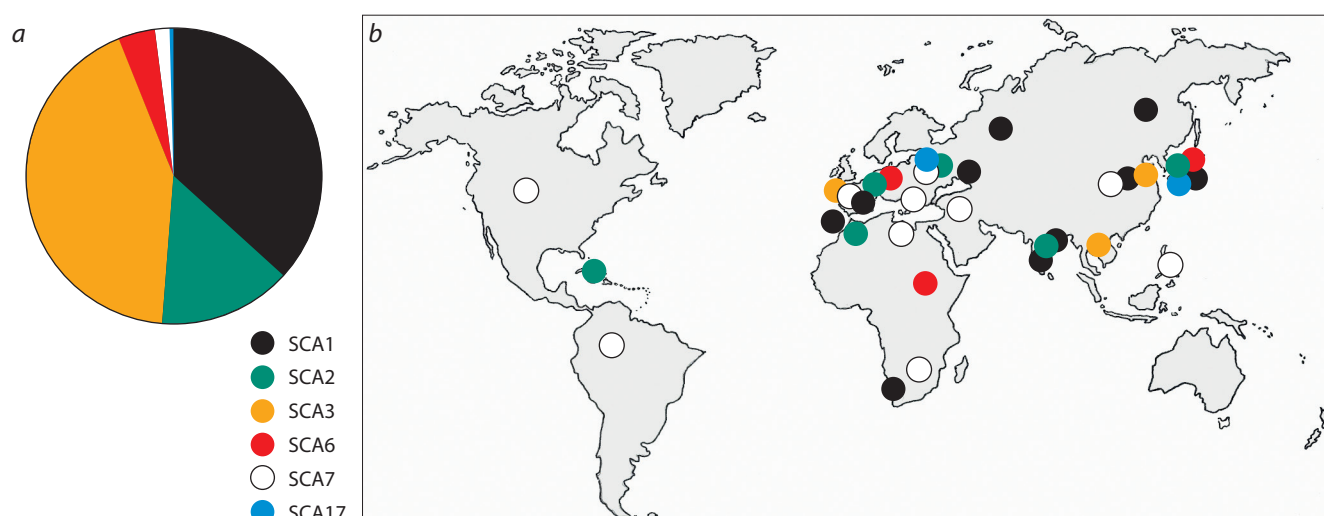
The total morbidity of polyglutamine SCAs is dramatically variable and varies around 1–9 per 100.000 with more accurate accounts being 4–5 per 100.000.

SCA1 is observed, approximately, at a frequency of 1–2 people per 100.000 of “general” population (Manto, 2005). SCA2 has been revealed in 14 % of cases of all SCAs, which makes up about 0.6 per 100.000 population (Cancel et al., 1997; Geschwind et al., 1997a; Riess et al., 1997). SCA3 at some areas is the most common autosomal dominant SCA (Schols et al., 2004; Bauer et al., 2005). The frequency of SCA3 is ~1.5–2 persons per 100.000 population (van de Warrenburg et al., 2002). The world-wide incidence of SCA6 comes near 0.02–0.31 per 100.000 population (Geschwind et al., 1997b; Ikeuchi et al., 1997; Matsumura et al., 1997; Matsuyama et al., 1997; Riess et al., 1997; Stevanin et al., 1997; Schöls et al., 1998; Pujana et al., 1999; Jiang et al., 2005). The incidence of SCA7 in several studies was 2 % of all SCAs, but according to the most accurate calculations it is 0.05–0.2 (an average 0.08) per 100.000 (Filla et al., 2000; Storey et al., 2000). Less than 100 families with SCA17 have been described to date (~0.0015 per 100.000) (Maruyama et al., 2002; Alendar et al., 2004; Craig et al., 2005) (Figure, a).

Overall, about 60 % of all clinical SCAs are polyglutamine SCAs, while the other identified and accurately diagnosed forms comprise less than 5 %. It is therefore important to note

Table 1. Molecular characteristics of polyglutamine SCAs

Disease	Locus	Gene	Protein	Polyglutamine chain	
				Norma	Pathology
SCA1	6p23	<i>Atxn1</i>	Ataxin-1	6–39	41–83
SCA2	12q24	<i>Atxn2</i>	Ataxin-2	14–32	34–77
SCA3	14q24-q31	<i>Atxn3</i>	Ataxin-3	12–40	55–86
SCA6	19p13	<i>CACNA1A</i>	α_{1A} P/Q Ca^{2+} channel	4–18	21–33
SCA7	3p21-p12	<i>Atxn7</i>	Ataxin-7	7–18	37–306
SCA17	6q27	<i>TBP</i>	TATA-box-binding protein	25–43	45–63



Worldwide distribution of polyglutamine SCAs.

a – the pie chart shows the percentage ratio of each polyglutamine SCA relative to the total number calculated per 100,000 population (SCA17 is only 0.037 % of the total, this value is not seen in the graph); b – on the World map is shown the place of occurrence of corresponding disease haplotypes (black and white circles).

that 35–40 % of SCAs have no established genetic base and are only characterized by the phenotype (Bird, 1998; Jayadev, Bird, 2013). At the same time, among polyglutamine SCAs, SCA1 and SCA3 comprise 2/3 of all registered cases (37 and 42 % respectively) (see Figure, a).

Polyglutamine SCAs prevalence rate in Russia

Research into polyglutamine diseases in Russia has been carried out for over 20 years. The prevalence of polyglutamine SCAs in Russia is similar to those in the European populations, but there are also differences. From 105 Russian families (excepting the Yakut population) with polyglutamine diseases, SCA1, 2, 3, 6, 7 and 17 was diagnosed in 61 families. The prevalence of SCAs are: SCA1, 28 families (46 %); SCA2, 21 (34.4 %); SCA3, 7 (11.5 %); SCA6, 1 family; and SCA7, 1 family (per 1.6 %). SCA17 was found in 3 families (Klyushnikov et al., 2016, 2017). Thus, characteristic in the Russian population is a low incidence of SCA3, while in populations of the USA and Japan it is the most frequent pathology (Klyushnikov et al., 2008). Notably, the prevalence of SCA17 is very high in comparison to the distribution in global population.

It is interesting that the preponderance of SCA1 over SCA3 is common in yet another population of the Eastern Europe,

Poland. The morbidity of polyglutamine SCAs in Polish population is as follows: SCA1, 83.6 %; SCA2, 13.9 %; SCA3, 0.6 %; and SCA17, 1.8 % (Krysa et al., 2016).

Genetic aspects of the origin and expansion of polyglutamine SCAs genesis

Advancements in population genetics and paleogenetics have allowed scientists to trace when polyglutamine SCAs appeared in the human population. The mutation of a gene is quite an unusual phenomenon, therefore such diseases are characterized by the presence of the founder, the person who for the first time gained a certain mutation and became the origin of the unique genetic profile called “haplotype”. Analyses of haplotypes help reveal the dynamics, common factors that affect the disease and predict the development of this pathology in the future. In polyglutamine SCAs, several haplotypes of founders were traced, with at least 2–3 separate haplotypes in each population (Lund et al., 2001; Bettencourt, Lima, 2011) (see Figure, b and Table 2). Usually, the mytation rate is higher and/or the mutation is older when it can be detected in wider populations or when it can be detected with a higher incidence (Lund et al., 2000; Bettencourt, Lima, 2011). However, due to the “anticipation” phenomenon, these two factors are mutually

Table 2. Worldwide distribution of polyglutamine SCAs

Mutation rate	SCA	Haplotype	Place of inhabitation	References
Slow (time of origin 80.000 years ago and later)	SCA3	Asiatic	Taiwan, India, Japan, Australia	Gaspar et al., 2001; Verbeek et al., 2004
		Portuguese (global distribution due to the great geographical discoveries)	North America, Germany, France, Portugal, Brazil, India, China, Australia	Bettencourt, Lima, 2011; Martins et al., 2012
		Cambodian (possibly a variation of the Portuguese haplotype)	Cambodia, United States	Jayadev et al., 2006
	SCA6	Paleolithic (before the division of humanity into races)	England, Japan, Brazil, Finland	Craig et al., 2008
		German	North Rhine-Westphalia	Dichgans et al., 1999
		Japanese	Tottori Prefecture	Mori et al., 2001
Fast (time of origin 900 years ago and later)	SCA1	Japanese	Miyagi and Yamagata Prefectures	Wakisaka et al., 1995; Zhou et al., 2001
		Yakut	Russia (Yakutia), China	Gouriev, 2004; Osakovsky et al., 2004; Zhou et al., 2001
		Hindustani	India (Bihar)	Mittal et al., 2005; Sinha et al., 2004
		Tamil	India (Tamil Nadu)	Mittal et al., 2005; Rengaraj et al., 2005
		Western Cape (3 haplotype may be present at once)	South Africa (Western Cape)	Ramesar et al., 1997
		Spanish	Girona, Catalonia	Pujana et al., 1999
		Italian	Southern Italy	Jodice et al., 1993
		Eastern European	Russia, Ukraine, Belarus	Popova et al., 2001
		Bashkir	Republic of Bashkiria	»
		Polish	Wielkopolska and Lodz Voivodeship	Krysa et al., 2016
	SCA2	Western European	Germany, France	Didierjean et al., 1999
		Pan-European	France, Germany, Serbia	»
		North African	Morocco, Libya	»
		Caribbean	Jamaica, Cuba	»
		Indian	India (Bihar)	Choudhry et al., 2001
		Japanese	Gunma Prefecture	Mizushima et al., 1998
	SCA7	Haplotype of Continental Europe	Belgium, Finland, France, Germany, Sweden and UK	Stevanin et al., 1999
		Italian	Italy	»
		Asiatic	Korea and Philippines	»
		Middle Eastern	Israel	»
		Anglo-Saxon	UK, USA	»
		North African	Algeria, Morocco, Tunisia	»
		South American	Brazil	»
		Scandinavian	Sweden	Jonasson et al., 2000
		South African	South African	Greenberg et al., 2006
		Japanese	Niigata Prefecture	Koide et al., 1999
	SCA17	German (high instability of CAG repeats)	Northern Germany	Zühlke et al., 2005
		German (low instability of CAG repeats)	Germany	De Michele et al., 2003; Zühlke et al., 2003

exclusive in polyglutamine SCAs. This conclusion could be suspected by comparing the haplotype numbers and SCA time of origin (see Table 2).

According to the mutation speed, age of clinical presentation and time of origin, polyglutamine SCAs can be divided conditionally into two groups. The first comprises diseases

with early presentation and low speed of mutations, SCA3 and SCA6. 2–3 haplotypes are known for each polyglutamine disease.

In the case of SCA6, the size of the area occupied by the diseased population directly correlates with the time of its origin. The worldwide distribution of this pathology charac-

terized by a very low degree of mutation can be linked to the presence of a Paleolithic haplotype which arose before the division of humanity into races (about 80.000 years ago) (Craig et al., 2008). The Asiatic haplotype of SCA3 arose in the prehistoric period (about 7.000 years ago). People with this haplotype live in South and Southeast Asia, and also in northeastern part of Australia (Martins et al., 2012). However, the worldwide distribution of SCA3 is explained differently. The Portuguese haplotype arose ~1400 years ago and was local until the era of great geographical discoveries (Bettencourt, Lima, 2011). The active exploration of the World Ocean by the Portuguese resulted in this haplotype quickly spreading to the countries of Asia and the New World (Martins et al., 2012). While these haplotypes make a significant contribution to the incidence of SCA3 and SCA6, there are also “younger” local haplotypes all over the World (Dichgans et al., 1999; Mori et al., 2001; Jayadev et al., 2006).

The widespread distribution of SCA1, SCA2, SCA7 and SCA17 in the world population is due to a different reason than SCA3, SCA6. These diseases are characterized by a high level of mutations. The mutations that cause these diseases are relatively young: in most cases, they are present only in 1–20 generations and are common within various ethnic groups. Patients with these polyglutamine SCAs exhibit numerous haplotypes, in some cases these are just individual haplotypes in a single population.

SCA1 is distributed worldwide, however, the main proportion are local haplotypes. It could be seen clearly in populations of islands and remote areas with low migration rates (Wakisaka et al., 1995; Wadia et al., 1998; Sinha et al., 2004; Mittal et al., 2005; Rengaraj et al., 2005). In other regions, such as Eastern Europe, migration was always high and it led to the spread of SCA1 to different parts of the Eurasian continent. The prevalence of SCA1 in the Russian population is due to the presence of three specific haplotypes (Eastern European, Yakut and Bashkir) (Popova et al., 2001; Gouriev, 2004).

The same tendency could be seen in other polyglutamine SCAs with high mutation rates (SCA2, SCA7 and SCA17). Here there is a large number of “young” haplotypes all over the World (Mizushima et al., 1998; Didierjean et al., 1999; Koide et al., 1999; Stevanin et al., 1999; Jonasson et al., 2000; Choudhry et al., 2001; De Michele et al., 2003; Zühlke et al., 2003, 2005; Greenberg et al., 2006). There are huge “white spots” on the World Map, which may contain a large number of yet unknown haplotypes of the polyglutamine SCAs with unique genetic signatures and clinical features. Within Africa, the northern and southern parts are relatively well studied, and several haplotypes were found among peoples living in these territories (Ramesar et al., 1997; Stevanin et al., 1999; Greenberg et al., 2006), whereas the central part of Africa remains completely unexplored.

The data obtained by Japanese researchers confirm that the incidence of polyglutamine SCA is not static, it is a dynamic process that continues and changes continuously. For example, a Japanese girl with SCA17 from Niigata Prefecture was described who had a *de novo* duplication from her father's allele (Koide et al., 1999). Therefore, she could be “founder” of a new haplotype.

The study of the haplotypes of polyglutamine SCA is important for practical medicine. In the German population,

there are two haplotypes of SCA17. The first haplotype is characterized by a high instability of CAG repeats during transmission (Zühlke et al., 2005). The second haplotype is more stable (De Michele et al., 2003; Zühlke et al., 2003). For this reason, the identification of a haplotype is important not only for assessing the incidence in a single population, but also for predicting the course of the disease and for medical-genetic counseling of patients.

Isolation as a factor in the incidence of polyglutamine SCAs enhancement

Isolation is a strong factor contributing to polyglutamine SCAs. Isolation could be seen not only in areas with a low migration history due to the remoteness of the place or ethnic characteristics, but also it could be linked to traditions leading to closely related marriages (Dedov et al., 2004; Maximova et al., 2008). The most vivid example of natural isolation is the population of the small island named Flores of the Azores archipelago, where there is the highest incidence of SCA3 in the world, 1 of 140 people (Lima et al., 1998). Another striking case of natural isolation is the larger Yakut population, where the incidence of SCA1 is about 46 cases per 100 thousand population (Platonov et al., 2016). Until the XX century, the population of the Japanese islands remained in relative isolation from other peoples. Confirmation of this can be found in the official data of SCA1 incidence in Miyagi and Yamagata Prefectures where the migration rate is the lowest in Japan (Wakisaka et al., 1995). However, geographical isolation is always a relative phenomenon. Thus, in China, not only Chinese but also Yakut and Japanese haplotypes have been reported (Zhou et al., 2001).

However, a high level of genetic isolation of a certain group of people may be due not only to geographical factors. The ethological (cultural, ethnic etc.) isolation of small populations in India, who obey a cast system, also leads to impressive consequences. Thus, SCA1, which is uncharacteristic of India, is observed in Tamil families living exclusively in two villages of Rajapalayam and Kottamedu of Tamil Nadu state, with an incidence of 1 SCA1 patient per 15 healthy residents (Rengaraj et al., 2005). In general, isolation has no global effect on morbidity (Mori et al., 2001), but it is a decisive factor for a specific group of people who live for a long time in the same territory.

Conclusions

Polyglutamine SCAs have appeared a long time ago and are spread all over the World. Insufficient information on polyglutamine SCAs does not allow accurate determination of the incidence and prevalence among some population groups. Extensive regions such as Africa, India, Southeast Asia, remain virtually unexplored in terms of these diseases. However, analysis of available data from population genetics reveals a number of features of polyglutamine SCAs. The common features with other hereditary diseases are the presence of the founder, the dependence of the prevalence on the age of the mutation and the frequency of mutagenesis, as well as the prevalence of SCAs in isolated populations. The specifics of SCAs is determined by their mechanism since they occur not due to spontaneous mutagenesis but result from duplications of pre-existing CAG repeats. This mechanism explains the

prevalence of polyglutamine SCAs over others SCAs in the global population, and also the phenomenon of “anticipation”. The anticipation needs to be taken into account in order to explain the dependence of the time of presentation of the disease on the rate of mutation.

One may speculate that 5–7 thousand years ago mainly diseases with a low mutation rate (*SCA3* and *SCA6*) were present, since types with high rates (*SCA1*, *SCA2*, *SCA7* and *SCA17*) lead to a rapid elongation of CAG repeats and the manifestation of the disease at younger ages in subsequent generations, which inevitably leads to the exclusion of the affected individuals from the process of reproduction.

The study of polyglutamine SCAs from the point of view of population genetics makes it possible to better determine their place in the context of genetic diseases of the brain and to understand the biological, ethnic and social features of these diseases. The development of molecular genetics will allow the scientists to cover, in the future, a wide range of populations in Africa, Asia and South America, which might not only change our understanding of the time and pattern of distribution of polyglutamine SCAs, but also reveal new mechanisms of the mutation process and disease progression.

References

- Alendar A., Euljkovic B., Savic D., Djarmati A., Keckarevic M., Ristic A., Dragasevic N., Kosic V., Romac S. Spinocerebellar ataxia type 17 in the Yugoslav population. *Acta Neurol. Scand.* 2004;109:185-187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763955>.
- Babovic-Vuksanovic D., Snow K., Patterson M.C., Michels V.V. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion. *Am. J. Med. Genet.* 1998;79:383-387. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9779806>.
- Bauer P.O., Zumrova A., Matoska V., Marikova T., Krilova S., Boday A., Singh B., Goetz P. Absence of spinocerebellar ataxia type 3/ Machado-Joseph disease within ataxic patients in the Czech population. *Eur. J. Neurol.* 2005;12(11):851-857. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16241973>.
- Bettencourt C., Lima M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J. Rare Dis.* 2011;6:35. DOI 10.1186/1750-1172-6-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635785>.
- Bird T.D. Hereditary Ataxia Overview. 1998. Oct. 28 [Updated 2018 Sep. 27]. Eds. M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>.
- Brais B., Bouchard J.P., Xie Y.G., Rochefort D.L., Chretien N., Tome F.M., Lafreniere R.G., Rommens J.M., Uyama E., Nohira O., Blumen S., Korczyn A.D., Heutink P., Mathieu J., Duranceau A., Codere F., Fardeau M., Rouleau G.A., Korczyn A.D. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1998;18:164-167. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9462747>.
- Brook J.D., McCurrach M.E., Harley H.G., Buckler A.J., Church D., Aburatani H., Hunter K., Stanton V.P., Thirion J.P., Hudson T., Sohn R., Zeman B., Snell R.G., Rundle S.A., Crow S., Davies J., Shelbourne P., Buxton J., Jones C., Juvonen V., Johnson K., Harper P.S., Shaw D.J., Housman D.E. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3'-end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* 1992;68(4):799-780. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310900>.
- Campuzano V., Montermini L., Moltò M.D., Pianese L., Cossée M., Cavalcanti F., Monros E., Rodius F., Duclos F., Monticelli A., Zera F., Cañizares J., Koutnikova H., Bidichandani S.I., Gellera C., Brice A., Trouillas P., De Michele G., Filla A., De Frutos R., Palau F., Patel P.I., Di Donato S., Mandel J.L., Coccozza S., Koenig M., Pandolfo M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science.* 1996;271(5254):1423-1427. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596916>.
- Cancel G., Dürr A., Didierjean O., Imbert G., Bürk K., Lezin A., Belal S., Benomar A., Abada-Bendib M., Vial C., Guimarães J., Chneiweiss H., Stevanin G., Yvert G., Abbas N., Saudou F., Lebre A.S., Yahyaoui M., Hentati F., Vernant J.C., Klockgether T., Mandel J.L., Agid Y., Brice A. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families. *Hum. Mol. Genet.* 1997;6(5):709-715. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158145>.
- Choudhry S., Mukerji M., Srivastava A.K., Jain S., Brahmachari S.K. CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(21):2437-2446. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689490>.
- Craig K., Keers S.M., Walls T.J., Curtis A., Chinnery P.F. Minimum prevalence of spinocerebellar ataxia 17 in the north east of England. *J. Neurol. Sci.* 2005;239:105-109. DOI 10.1016/j.jns.2005.08.009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223509>.
- Craig K., Takiyama Y., Soong B.W., Jardim L.B., Saraiva-Pereira M.L., Lythgow K., Morino H., Maruyama H., Kawakami H., Chinnery P.F. Pathogenic expansions of the SCA6 locus are associated with a common CACNA1A haplotype across the globe: founder effect or predisposing chromosome? *Eur. J. Hum. Genet.* 2008;16:841-847. DOI 10.1038/ejhg.2008.20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285829>.
- David G., Abbas N., Stevanin G., Dürr A., Yvert G., Cancel G., Weber C., Imbert G., Saudou F., Antoniou E., Drabkin H., Gemmill R., Giunti P., Benomar A., Wood N., Ruberg M., Agid Y., Mandel J.L., Brice A. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat. Genet.* 1997;17:65-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288099>.
- De Michele G., Maltecca F., Carella M., Volpe G., Orio M., De Falco A., Gombia S., Servadio A., Casari G., Filla A., Bruni A. Dementia, ataxia, extrapyramidal features, and epilepsy: phenotype spectrum in two Italian families with spinocerebellar ataxia type 17. *Neurol. Sci.* 2003;24:166-167. DOI 10.1007/s10072-003-0112-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14598069>.
- Dedov I.I., Kalinchenko N.Y., Semicheva T.V., Tyulpakov A.N., Peterkova V.A., Prasolov V.S., Rubtsov P.M., Sverdlova P.S., Kuznetsova E.S., Bakanova T.D. Molecular analysis of CYP21 gene in patients with inborn dysfunction of epinephal glands with 21-hydroxylase deficite. *Problems of Endocrinology.* 2004;4:3-6. <http://www.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=112879>. (in Russian).
- Dichgans M., Schöls L., Herzog J., Stevanin G., Weirich-Schwaiger H., Rouleau G., Bürk K., Klockgether T., Zühlke C., Laccone F., Riess O., Gasser T. Spinocerebellar ataxia type 6: evidence for a strong founder effect among German families. *Neurology.* 1999;52(4):849-851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10078738>.
- Didierjean O., Cancel G., Stevanin G., Dürr A., Bürk K., Benomar A., Lezin A., Belal S., Abada-Bendib M., Klockgether T., Brice A. Linkage disequilibrium at the SCA2 locus. *J. Med. Genet.* 1999;36:415-417. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1734371/>.
- Dunnen D. Trinucleotide repeat disorders. *Handb. Clin. Neurol.* 2017;145:383-391. DOI 10.1016/B978-0-12-802395-2.00027-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28987184>.
- Filla A., Mariotti C., Caruso G., Coppola G., Coccozza S., Castaldo I., Calabrese O., Salvatore E., De Michele G., Riggio M.C., Pareyson D., Gellera C., Di Donato S. Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidolusian atrophy in 116 Italian families. *Eur. Neurol.* 2000;44:31-36. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894992>.
- Gardian G., Browne S.E., Choi D.K., Klivenyi P., Gregorio J., Kubilus J.K., Ryu H., Langley B., Ratan R.R., Ferrante R.J., Beal M.F. Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* 2005;

- 280(1):556-563. DOI 10.1074/jbc.M410210200. <http://www.jbc.org/content/280/1/556.long>.
- Gaspar C., Lopes-Cendes I., Hayes S., Goto J., Arvidsson K., Dias A., Silveira I., Maciel P., Coutinho P., Lima M., Zhou Y.X., Soong B.W., Watanabe M., Giunti P., Stevanin G., Riess O., Sasaki H., Hsieh M., Nicholson G.A., Brunt E., Higgins J.J., Lauritzen M., Tranebjaerg L., Volpini V., Wood N., Ranum L., Tsuji S., Brice A., Sequeiros J., Rouleau G.A. Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68:523-528. DOI 10.1086/318184. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235286/>.
- Gedeon A.K., Meinenen M., Ades L.C., Kaariainen H., Gecz J., Baker E., Sutherland G.R., Mulley J.C. Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: Identification of a gene near FRAXE. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;56:907-914. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7536393>.
- Geschwind D.H., Perlman S., Figueroa C.P., Treiman L.J., Pulst S.M. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 1997a;60:842-850. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106530>.
- Geschwind D.H., Perlman S., Figueroa K.P., Karrim J., Baloh R.W., Pulst S.M. Spinocerebellar ataxia type 6. Frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations. *Neurology.* 1997b;49:1247-1251. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371902>.
- Gouriev I.P. Genetic Archeological perspective on the origin of Yakuts. *Russ. J. Genet.* 2004;40(4):450-453. <https://link.springer.com/article/10.1023%3ARUGE.0000024984.49084.a8>.
- Greenberg J., Solomon G.A., Vorster A.A., Heckmann J., Bryer A. Origin of the SCA7 gene mutation in South Africa: implications for molecular diagnostics. *Clin. Genet.* 2006;70(5):415-417. DOI 10.1111/j.1399-0004.2006.00680.x
- Ikeuchi T., Takano H., Koide R., Horikawa Y., Honma Y., Onishi Y., Igarashi S., Tanaka H., Nakao N., Sahashi K., Tsukagoshi H., Inoue K., Takahashi H., Tsuji S. Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in alpha1A voltage-dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. *Ann. Neurol.* 1997;42:879-884. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403480>.
- Jayadev S., Bird T.D. Hereditary ataxias: overview. *Genet. Med.* 2013;15(9):673-683. DOI 10.1038/gim.2013.28. <https://www.nature.com/articles/gim201328>.
- Jayadev S., Michelson S., Lipe H., Bird T. Cambodian founder effect for spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *J. Neurol. Sci.* 2006;250:110-113. DOI 10.1016/j.jns.2006.08.006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17027034>.
- Jiang H., Tang B., Xia K., Zhou Y., Xu B., Zhao G., Li H., Shen L., Pan Q., Cai F. Spinocerebellar ataxia type 6 in Mainland China: molecular and clinical features in four families. *J. Neurol. Sci.* 2005;236:25-29. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979648>.
- Jodice C., Frontali M., Persichetti F., Novelletto A., Pandolfo M., Spadaro M., Giunti P., Schinaia G., Lulli P., Malaspina P. The gene for spinal cerebellar ataxia 1 (SCA1) is flanked by two closely linked highly polymorphic microsatellite loci. *Hum. Mol. Genet.* 1993;2(9):1383-1387.
- Jonasson J., Juvonen V., Sistonen P., Ignatius J., Johansson D., Björck E.J., Wahlström J., Melberg A., Holmgren G., Forsgren L., Holmberg M. Evidence for a common spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) founder mutation in Scandinavia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000;8(12):918-922. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175279>.
- Kawaguchi Y., Okamoto T., Taniwaki M., Aizawa M., Inoue M., Katayama S., Kawakami H., Nakamura S., Nishimura M., Akiguchi I., Kimura J., Narumiya S., Kakizuka A. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* 1994;8:221-228. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7874163>.
- Klyushnikov S.A., Abramicheva N.Y., Vetchinova A.S., Nuzhnyi E.L., Ershova M.V., Illarioshkin S.N. Genetic structure of autosomal dominant and autosomal recessive ataxies in Russian population. "Parkinson Disease and Movement Disorders". Under red. of S.N. Illarioshkin, O.S. Levin. Moscow: Luxury Print, 2017;258-262. (in Russian)
- Klyushnikov S.A., Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A. Molecular analysis of polyglutamine diseases in Russia. "Parkinson Disease and Movement Disorders". Under red. of S.N. Illarioshkin, N.N. Yakhno. Moscow: OOO Dialog, 2008;69-75. (in Russian)
- Klyushnikov S.A., Prikhodko D.A., Abramicheva N.Y., Ivanova E.O., Illarioshkin S.N. Spinocerebellar ataxia type 17: first description in Russian population. *Degenerative and Vascular Diseases of Neural System.* 2016;37-39. (in Russian)
- Koide R., Ikeuchi T., Onodera O., Tanaka H., Igarashi S., Endo K., Takahashi H., Kondo R., Ishikawa A., Hayashi T., Saito M., Tomoda A., Miike T., Naito H., Ikuta F., Tsuji S. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat. Genet.* 1994;6:9-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136840>.
- Koide R., Kobayashi S., Shimohata T., Ikeuchi T., Maruyama M., Saito M., Yamada M., Takahashi H., Tsuji S. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TA-TA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Mol. Genet.* 1999;8(11):2047-2053. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484774>.
- Kovtun I.V., Liu Y., Bjoras M., Klungland A., Wilson S.H., McMur-ray C.T. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature.* 2007;447:447-452. DOI 10.1038/nature05778. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450122>.
- Kovtun I.V., McMurray C.T. Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat. Genet.* 2001;27:407-411. DOI 10.1038/86906. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279522>.
- Kremer E., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R., Richards R.I. DNA instability at the fragile X maps to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science.* 1991;252:1711-1714. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675488>.
- Krysa W., Sulek A., Rakowicz M., Szirkowicz W., Zaremba J. High relative frequency of SCA1 in Poland reflecting a potential founder effect. *Neurol. Sci.* 2016;37(8):1319-1325. DOI 10.1007/s10072-016-2594-x.
- La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E., Fischbeck K.H. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar atrophy. *Nature.* 1991;352:77-79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062380>.
- Lalio M.D., Scott H.S., Antonarakis S.E. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat. Genet.* 1997;17(1):17. DOI 10.1038/ng0997-17. <https://www.nature.com/articles/ng0997-17>.
- Lima M., Mayer F.M., Coutinho P., Abade A. Origins of a mutation: population genetics of Machado-Joseph disease in the Azores (Portugal). *Hum. Biol.* 1998;70(6):1011-1023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825593>.
- Liquori C.L., Ricker K., Moseley M.L., Jacobsen J.F., Kress W., Naylor S.L., Day J.W., Ranum L.P. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293:864-867. DOI 10.1126/science.1062125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486088>.
- Lund A., Udd B., Juvonen V., Andersen P.M., Cederquist K., Davis M., Gellera C., Kölmel C., Ronnevi L.O., Sperfeld A.D., Sörensen S.A., Tranebjaerg L., Van Maldergem L., Watanabe M., Weber M., Yeung L., Savontaus M.L. Multiple founder effects in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA, Kennedy disease) around the world. *Eur. J. Hum. Genet.* 2001;9(6):431-436. DOI 10.1038/sj.ejhg.5200656. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11436124>.
- Lund A., Udd B., Juvonen V., Andersen P.M., Cederquist K., Ronnevi L.O., Sistonen P., Sörensen S.A., Tranebjaerg L., Wallgren-Pettersson C., Savontaus M.L. Founder effect in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) in Scandinavia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000;8:631-636. DOI 10.1038/sj.ejhg.5200517. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951525>.

- Manto M.U. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum*. 2005;4:2-6. DOI 10.1080/14734220510007914.
- Martins S., Soong B.W., Wong V.C.N., Giunti P., Stevanin G., Rannum L.P.W., Sasaki H., Riess O., Tsuji S., Coutinho P., Amorim A., Sequeiros J., Nicholson G.A. Mutational origin of Machado-Joseph disease in the Australian Aboriginal communities of Groote Eylandt and Yirrkala. *Arch. Neurol.* 2012;69(6):746-751. DOI 10.1001/archneurol.2011.2504. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/10.1001/archneurol.2011.2504>.
- Maruyama H., Izumi Y., Morino H., Oda M., Toji H., Nakamura S., Kawakami H. Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am. J. Med. Genet.* 2002;114:578-583. DOI 10.1002/ajmg.10514. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.10514>.
- Matilla T., Volpini V., Genis D., Rosell J., Corral J., Davalos A., Molins A., Estivill X. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum. Mol. Genet.* 1993;2:2123-2128. <https://academic.oup.com/hmg/article-pdf/2/12/2123/1829263/2-12-2123.pdf>.
- Matsumura R., Futamura N., Fujimoto Y., Yanagimoto S., Horikawa H., Suzumura A., Takayanagi T. Spinocerebellar ataxia type 6. Molecular and clinical features of 35 Japanese patients including one homozygous for the CAG repeat expansion. *Neurology*. 1997;49:1238-1243. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371900>.
- Matsuyama Z., Kawakami H., Maruyama H., Izumi Y., Komure O., Uda F., Kameyama M., Nishio T., Kuroda Y., Nishimura M., Nakamura S. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum. Mol. Genet.* 1997;6:1283-1287. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259274>.
- Mittal U., Sharma S., Chopra R., Dheeraj K., Pal P.K., Srivastava A.K., Mukerji M. Insights into the mutational history and prevalence of SCA1 in the Indian population through anchored polymorphisms. *Hum. Genet.* 2005;118:107-114. DOI 10.1007/s00439-005-0018-8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-005-0018-8>.
- Mizushima K., Watanabe M., Abe K., Aoki M., Itoyama Y., Shizuka M., Okamoto K., Shoji M. Analysis of spinocerebellar ataxia type 2 in Gunma Prefecture in Japan: CAG trinucleotide expansion and clinical characteristics. *J. Neurol. Sci.* 1998;156(2):180-185. DOI 10.1016/S0022-510X(98)00040-9.
- Mori M., Adachi Y., Kusumi M., Nakashima K. Spinocerebellar ataxia type 6: founder effect in Western Japan. *J. Neurol. Sci.* 2001;185(1):43-47. DOI 10.1016/S0022-510X(01)00453-1. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X01004531?via%3Dihub>.
- O'Hearn E., Holmes S.E., Calvert P.C., Ross C.A., Margolis R.L. SCA-12: Tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with a CAG repeat expansion. *Neurology*. 2001;56:299-303. DOI 10.1212/WNL.56.3.299. <http://n.neurology.org/content/56/3/299.long>.
- Osakovsky V.L., Shatunov A.Y., Goldfarb L.G., Platonov P.A. Estimation of mutant chromosome in SCA1 gene in Yakut population. *Yakut Medical Journal*. 2004;2(6):63. (in Russian)
- Pearson C.E., Nichol Edamura K., Cleary J.D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat. Rev. Genet.* 2005;6:729-742. DOI 10.1038/nrg1689. <https://www.nature.com/articles/nrg1689>.
- Platonov F.A., Tyryshkin K., Tikhonov D.G., Neustroyeva T.S., Sivtseva T.M., Yakovleva N.V., Nikolaev V.P., Sidorova O.G., Kononova S.K., Goldfarb L.G., Renwick N.M. Genetic fitness and selection intensity in a population affected with high-incidence spinocerebellar ataxia type 1. *Neurogenetics*. 2016;17:179-185. DOI 10.1007/s10048-016-0481-5. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10048-016-0481-5>.
- Popova S.N., Slominsky P.A., Pocheshnova E.A., Balanovskaya E.V., Tarskaya L.A., Bebyakova N.A., Bets L.V., Ivanov V.P., Livshits L.A., Khusnutdinova E.K., Spitcyn V.A., Limborska S.A. Polymorphism of trinucleotide repeats in loci DM, DRPLA and SCA1 in East European populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2001;9:829-835.
- Potaman V.N., Bissler J.J., Hashem V.I., Oussatcheva E.A., Lu L., Shlyakhtenko L.S., Lyubchenko Y.L., Matsuura T., Ashizawa T., Leffak M., Benham C.J., Sinden R.R. Unpaired structures in SCA10 (ATTCT)_n(AGAAT)_n repeats. *J. Mol. Biol.* 2003;326:1095-1111. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283603000378?via%3Dihub>.
- Pujana M.A., Corral J., Gratacos M., Combarros O., Berciano J., Genis D., Banchs I., Estivill X., Volpini V. Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group. *Hum. Genet.* 1999;104:516-522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453742>.
- Ramesar R.S., Bardien S., Beighton P., Bryer A. Expanded CAG repeats in spinocerebellar ataxia (SCA1) segregate with distinct haplotypes in South african families. *Hum. Genet.* 1997;100(1):131-137.
- Rengaraj R., Dhanaraj M., Arulmozhi T., Chattopadhyay B., Battacharyya N.P. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 in an ethnic Tamil community in India. *Neurol. India*. 2005;53(3):308-311. DOI 10.4103/0028-3886.16929. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230798>.
- Riess O., Laccone F.A., Gispert S., Schols L., Zuhlke C., Vieira-Saecker A.M., Herlt S., Wessel K., Epplen J.T., Weber B.H., Kreuz F., Chahrokh-Zadeh S., Meindl A., Lunkes A., Aguiar J., Macek M., Krebsova A., Macek M., Burk K., Tinschert S., Schreyer I., Pulst S.M., Auburger G. SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics*. 1997;1:59-64. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s100480050009.pdf>.
- Riess O., Schöls L., Bottger H., Nolte D., Vieira-Saecker A.M., Schimming C., Kreuz F., Macek M., Krebsova A., Macek M., SenKlockgether T., Zuhlke C., Laccone F.A. SCA6 is caused by moderate CAG expansion in the alpha1A-voltage-dependent calcium channel gene. *Hum. Mol. Genet.* 1997;6:1289-1293. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259275>.
- Schöls L., Bauer P., Schmidt T., Schulte T., Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 2004;3:291-304. DOI 10.1016/S1474-4422(04)00737-9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442204007379?via%3Dihub>.
- Schöls L., Krüger R., Amoiridis G., Przuntek H., Epplen J.T., Riess O. Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1998;64:67-73. <https://jnnp.bmj.com/content/64/1/67.long>.
- Sinha K., Worth P.F., Jha D.K., Sinha S., Stinton V.J., Davis M.B., Wood N.W., Sweeney M.G., Bhatia K.P. Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2004;75:448-452. DOI 10.1136/jnnp.2002.004895. <https://jnnp.bmj.com/content/75/3/448>.
- Stevanin G., David G., Durr A., Giunti P., Benomar A., Abada-Bendib M., Lee M.S., Agid Y., Brice A. Multiple origins of the spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) mutation revealed by linkage disequilibrium studies with closely flanking markers, including an intragenic polymorphism (G3145TG/A3145TG). *Eur. J. Hum. Genet.* 1999;7:889-896. DOI 10.1038/sj.ejhg.5200392. <https://www.nature.com/articles/5200392>.
- Stevanin G., Durr A., Brice A. Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000;8:4-18. DOI 10.1038/sj.ejhg.5200403. <https://www.nature.com/articles/5200403>.
- Stevanin G., Durr A., David G., Didierjean O., Cancel G., Rivaud S., Tourbah A., Warter J.M., Agid Y., Brice A. Clinical and molecular features of spinocerebellar ataxia type 6. *Neurology*. 1997;49:1243-1246. DOI 10.1212/WNL.49.5.1243. <http://n.neurology.org/content/49/5/1243>.
- Storey E., du Sart D., Shaw J.H., Lorentzos P., Kelly L., McKinley Gardner R.J., Forrest S.M., Biros I., Nicholson G.A. Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am. J. Med. Genet.* 2000;95:351-357. DOI 10.1002/1096-8628(20001211)95:4<351::AID-

- AJMG10>3.0.CO;2-R. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11186889>.
- van de Warrenburg B.P., Sinke R.J., Verschuuren-Bemelmans C.C., Scheffer H., Brunt E.R., Ippel P.F., Maat-Kievit J.A., Dooijes D., Notermans N.C., Lindhout D., Knoers N.V., Kremer H.P. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*. 2002;58(5):702-708. DOI 10.1212/WNL.58.5.702. <http://n.neurology.org/content/58/5/702.long>.
- Verbeek D.S., Piersma S.J., Hennekam E.F., Ippel E.F., Pearson P.L., Sinke R.J. Haplotype study in Dutch SCA3 and SCA6 families: evidence for common founder mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004; 12:441-446. DOI 10.1038/sj.ejhg.5201167. <https://www.nature.com/articles/5201167>.
- Verkerk A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F.P., Eussen B.E., van Ommen G.J., Blonden L.A., Riggins G.J., Chastain J.L., Kunst C.B., Galjaard H., Caskey C.T., Nelson D.L., Oostra B.A., Warren S.T. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 1991;65(5):905-914. DOI 10.1016/0092-8674(91)90397-H. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749190397H?via%3Dihub>.
- Vincent J.B., Neves-Pereira M.L., Paterson A.D., Yamamoto E., Parikh S.V., Macciardi F., Gurling H.M., Potkin S.G., Pato C.N., Macedo A., Kovacs M., Davies M., Lieberman J.A., Meltzer H.Y., Petronis A., Kennedy J.L. An unstable trinucleotide-repeat region on chromosome 13 implicated in spinocerebellar ataxia: a common expansion locus. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;66:819-829. DOI 10.1086/302803. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1288165/>.
- Wadia N.H., Pang J., Desai J., Mankodi A., Desai M., Chamberlain S. A clinicogenetic analysis of six Indian spinocerebellar ataxia (SCA2) pedigrees: The significance of slow saccades in diagnosis. *Brain*. 1998;121:2341-2355. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9874485>.
- Wakisaka A., Sasaki H., Takada A., Fukazawa T., Suzuki Y., Hamada T., Iwabuchi K., Tashiro K., Yoshiki T. Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1) in the Japanese in Hokkaido may derive from a single common ancestry. *J. Med. Genet.* 1995;32:590-592. <https://jmg.bmj.com/content/32/8/590.long>.
- Warren S.T. The expanding world of trinucleotide repeats. *Science*. 1996;271(5254):1374-1375. DOI 10.1126/science.271.5254.1374. <http://science.sciencemag.org/content/271/5254/1374.long>.
- Xiang F., Almqvist E.W., Huq M., Lundin A., Hayden M.R., Edstrom L., Anvret M., Zhang Z. A Huntington disease-like neurodegenerative disorder maps to chromosome 20p. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;63:1431-1438. DOI 10.1086/302093. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377554/>.
- Zhou Y.X., Qiao W.H., Gu W.H., Xie H., Tang B.S., Zhou L.S., Yang B.X., Takiyama Y., Tsuji S., He H.Y., Deng C.X., Goldfarb L.G., Wang G.X. Spinocerebellar ataxia type 1 in China: molecular analysis and genotype-phenotype correlation in 5 families. *Arch. Neurol.* 2001;58(5):789-794. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/vol/58/pg/789>.
- Zhuchenko O., Bailey J., Bonnen P., Ashizawa T., Stockton D.W., Amos C., Dobyns W.B., Subramony S.H., Zoghbi H.Y., Lee C.C. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.* 1997;15:62-69. DOI 10.1038/ng0197-62. <https://www.nature.com/articles/ng0197-62>.
- Zoghbi H.Y., Orr H.T. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999;9(5):566-570. DOI 10.1016/S0959-4388(99)00013-6. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438899000136?via%3Dihub>.
- Zühlke C., Dalski A., Schwinger E., Finckh U. Spinocerebellar ataxia type 17: Report of a family with reduced penetrance of an unstable Gln49 TBP allele, haplotype analysis supporting a founder effect for unstable alleles and comparative analysis of SCA17 genotypes. *BMC Med. Genet.* 2005;6:27. DOI 10.1186/1471-2350-6-27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1177950/>.
- Zühlke C., Gehlken U., Hellenbroich Y., Schwinger E., Bürk K. Phenotypic variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene. Reduced penetrance in SCA17? *J. Neurol.* 2003;250:161-163. DOI 10.1007/s00415-003-0958-7. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00415-003-0958-7>.

ORCID ID

A.N. Shuvaev orcid.org/0000-0003-0078-4733
O.S. Belozor orcid.org/0000-0001-8384-5962
M.V. Smolnikova orcid.org/0000-0001-9984-2029
D.A. Yakovleva orcid.org/0000-0002-7458-127X
A.N. Shuvaev orcid.org/0000-0002-3887-1413
O.M. Kazantseva orcid.org/0000-0002-9597-2704
E.A. Pozhilenkova orcid.org/0000-0001-7857-0490
O.I. Mozhej orcid.org/0000-0002-5427-1688
S. Kasparov orcid.org/0000-0002-1824-1764

Acknowledgements. The scientific article was written with support of Russian Foundation of Basic Research (RFBR) grant KO_a 17-54-10005 and grant "Competitiveness Enhancement Program" for Immanuel Kant Baltic Federal University.

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

Received November 22, 2018. Revised March 19, 2019. Accepted March 22, 2019.

Роль ольфакторного транспорта в проникновении наночастиц оксида марганца из кровеносного русла в мозг

А.В. Ромашенко^{1,3}✉, М.Б. Шарапова¹, К.Н. Морозова¹, Е.В. Киселева¹, К.Э. Купер², Д.В. Петровский¹

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

² Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

Возможность поступления из носовой полости в головной мозг наночастиц (НЧ) различной природы не вызывает сомнения. Как уже было показано ранее, накопление НЧ в центральной нервной системе (ЦНС) может спровоцировать целый ряд неврологических заболеваний, поэтому понимание механизмов данного процесса представляет интерес как с научной, так и с практической точек зрения. Предполагается, что из крови НЧ могут проникнуть в ЦНС, исключительно преодолев гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Попав с поверхности легких в кровеносное русло, НЧ могут накапливаться в различных слизистых оболочках, в том числе и в слизистой носовой полости. Таким образом, нельзя исключать возможность транспорта НЧ из кровотока в мозг за счет их захвата окончаниями обонятельных нейронов. Для проверки этой гипотезы мы использовали парамагнитные НЧ оксида марганца (Mn_3O_4 -НЧ), паттерны накопления которых в структурах мозга мыши регистрировали с помощью Т1-взвешенной магнитно-резонансной томографии. В настоящем исследовании была проведена оценка влияния интраназальной аппликации ингибиторов эндоцитоза и аксонального транспорта на накопление Mn_3O_4 -НЧ в структурах ЦНС при их введении в носовую полость или в кровоток. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что перенос Mn_3O_4 -НЧ из носовой полости в мозг эффективнее их проникновения в ЦНС из кровеносного русла, которое может осуществляться как за счет локального преодоления ГЭБ, например при накоплении Mn_3O_4 -НЧ в зубчатой извилине гиппокампа, так и через захват и транспорт НЧ из крови клетками ольфакторного эпителия. При этом эксперименты с введением хлорпромазина, специфического ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза, и метил-β-циклодекстрина, вещества, разрушающего липидные рафты, участвующие в захвате веществ клетками эндотелия, продемонстрировали различия в механизмах захвата НЧ из носовой полости и кровеносного русла. В результате проведенного исследования нам удалось показать значимый вклад аксонального транспорта в поступление наночастиц в головной мозг как из носовой полости, так и из сосудистого русла. Это объясняет накопление в мозге субмикронных частиц различной природы (нейротропные вирусы, нерастворимые ксенобиотики и др.), которые не способны преодолевать ГЭБ. Полученные результаты будут полезны как для понимания патогенеза различных нейродегенеративных заболеваний, так и для исследования побочных эффектов терапевтических препаратов, вводимых внутривенно.

Ключевые слова: наночастицы; ольфакторный транспорт; магнитно-резонансная томография; внутривенное введение.

Для цитирования: Ромашенко А.В., Шарапова М.Б., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Купер К.Э., Петровский Д.В. Роль ольфакторного транспорта в проникновении наночастиц оксида марганца из кровеносного русла в мозг. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):482-488. DOI 10.18699/VJ19.517

The role of olfactory transport in the penetration of manganese oxide nanoparticles from blood into the brain

A.V. Romashchenko^{1,3}✉, M.B. Sharapova¹, K.N. Morozova¹, E.V. Kiseleva¹, K.E. Kuper², D.V. Petrovskii¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Budker Institute of Nuclear Physics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ The Institute of Computational Technologies, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

There is no doubt that various nanoparticles (NPs) can enter the brain from the nasal cavity. It is assumed that NPs can penetrate from blood into the central nervous system (CNS) only by breaking the blood-brain barrier (BBB). The accumulation of NPs in CNS can provoke many neurological diseases; therefore, the understanding of its mechanisms is of both academic and practical interest. Although hitting from the surface of the lungs into the bloodstream, NPs can accumulate in various mucous membranes, including the nasal mucosa. Thus, we cannot rule out the ability of NPs to be transported from the bloodstream to the brain through the olfactory uptake. To test this hypothesis, we used paramagnetic NPs of manganese oxide (Mn_3O_4 -NPs), whose accumulation patterns

in the mouse brain were recorded using T1-weighted magnetic resonance imaging. The effect of intranasal application of endocytosis and axonal transport inhibitors on the brain accumulation patterns of intranasally or intravenously injected Mn_3O_4 -NPs was evaluated. A comparative analysis of the results showed that the transport of Mn_3O_4 -NPs from the nasal cavity to the brain is more efficient than their local permeation through BBB into CNS from the bloodstream, for example with the accumulation of Mn_3O_4 -NPs in the dentate gyrus of the hippocampus, and through the capture and transport of NPs from the blood by olfactory epithelium cells. Also, experiments with the administration of chlorpromazine, a specific inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, and methyl- β -cyclodextrin, inhibitor of the lipid rafts involved in the capture of substances by endothelium cells, showed differences in the mechanisms of NP uptake from the nasal cavity and from the bloodstream. In this study, we show a significant contribution of axonal transport to NP accumulation patterns in the brain, both from the nasal cavity and from the vascular bed. This explains the accumulation of different sorts of submicron particles (neurotropic viruses, insoluble xenobiotics, etc.), unable to pass BBB, in the brain. The results will add to the understanding of the pathogenesis of various neurodegenerative diseases and help studying the side effects of therapeutics administered intravenously.

Key words: nanoparticles; olfactory transport; magnetic resonance imaging; intravenous injection.

For citation: Romashchenko A.V., Sharapova M.B., Morozova K.N., Kiseleva E.V., Kuper K.E., Petrovskii D.V. The role of olfactory transport in the penetration of manganese oxide nanoparticles from blood into the brain. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):482-488. DOI 10.18699/VJ19.517 (in Russian)

Введение

Люди, как и другие наземные животные, постоянно подвергаются воздействию твердых аэрозолей, в состав которых могут входить разнообразные ксенобиотики. Оседая на слизистых верхних и нижних дыхательных путей, субмикронные и наноразмерные аэрозоли способны проникать в кровь и накапливаться во внутренних органах, включая головной мозг. Как показывает целый ряд экспериментальных исследований, накопление твердых частиц в мозге животного приводит к нарушению в работе дофаминовой и серотониновой систем мозга и, как следствие, к нейродегенерации (Tranfield, Walker, 2012). Кроме того, показано, что у людей, живущих на расстоянии менее 50 м до автострад, резко возрастает риск развития болезни Альцгеймера. Анализ зависимости эпидемиологической ситуации от концентрации твердых аэрозолей и выхлопных газов в атмосфере показал, что на риск нейродегенеративной патологии оказывает влияние концентрация именно твердых частиц в воздухе, а не компонентов выхлопных газов (Chen et al., 2017).

Несмотря на это, в качестве основных мишеней для поражающего действия наноаэрозолей рассматривают дыхательную и сердечно-сосудистую системы (Donaldson et al., 2002; Chen et al., 2008; Brook et al., 2010; Kampfrath et al., 2011). Соответственно, большая часть исследований посвящена изучению поральной роли легких в проникновении наночастиц в кровь и их аккумуляции во внутренних органах, в том числе в мозге. Однако в настоящее время имеется значительное количество экспериментальных данных, указывающих на ведущую роль назального эпителия в транспорте наноаэрозолей напрямую из окружающей среды в мозг (Kreyling, 2016). Для ряда вирусов основным путем проникновения в центральную нервную систему млекопитающих является транспорт из носовой полости в мозг. К ним относят: вирус герпеса (HSV-1, HSV-2) (Kennedy, Chaudhuri, 2002), вирус гриппа А (Tanaka et al., 2003), борнавирусы (Sauder, Staeheli, 2003), рабдовирусы, в том числе вирус бешенства (Astin et al., 1993), парагрипп (Mori et al., 2004), прионы (Zanusso et al., 2003). Основу ольфакторного транспорта, обеспечивающего перемещение вирусов, как, возможно,

и наночастиц (Mistry et al., 2009), из носовой полости в мозг, составляет захват вирионов окончаниями обонятельных нервов с последующим перемещением внутри аксонов и преодолением синаптических передач (Mori et al., 2005).

Поскольку носовая полость характеризуется высоким уровнем васкуляризации, существует вероятность того, что наночастицы (НЧ) проникают в кровяное русло, а уже оттуда поступают в мозг. Для оценки вклада данного процесса в формирование наблюдаемых пространственно-временных паттернов распределения НЧ в мозге мышей мы провели сравнение накопления НЧ в центральной нервной системе (ЦНС) при их интраназальном и внутривенном введениях. В настоящем исследовании были использованы наночастицы оксида марганца (Mn_3O_4 -НЧ), которые благодаря способности марганца сокращать время T1-релаксации протонов эффективно детектируются магнитно-резонансной томографией (МРТ). Оценку накопления Mn_3O_4 -НЧ, основанную на изменении МРТ-сигнала в структурах мозга мыши, проводили через 12 ч после интраназального/внутривенного введения. Это время, согласно данным литературы и нашим предварительным экспериментам, соответствует максимальному накоплению в обонятельных луковицах интраназально введенных наночастиц (Khlebtsov, Dykman, 2011). Для выявления роли ольфакторных нейронов в транспорте Mn_3O_4 -НЧ из носовой полости или кровеносного русла в мозг было исследовано влияние предварительной назальной аппликации ингибиторов эндоцитоза и аксонального транспорта на уровень МРТ-сигнала в ЦНС.

Материалы и методы

Животные. Для экспериментов были использованы самцы мышей SPF-статуса инбредной линии Balb/c в возрасте 10–12 нед (25–32 г). Всего в исследовании было использовано 64 особи. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Экспериментальные животные содержались в клетках однополыми семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы OptiMice (Animal Care Systems) в

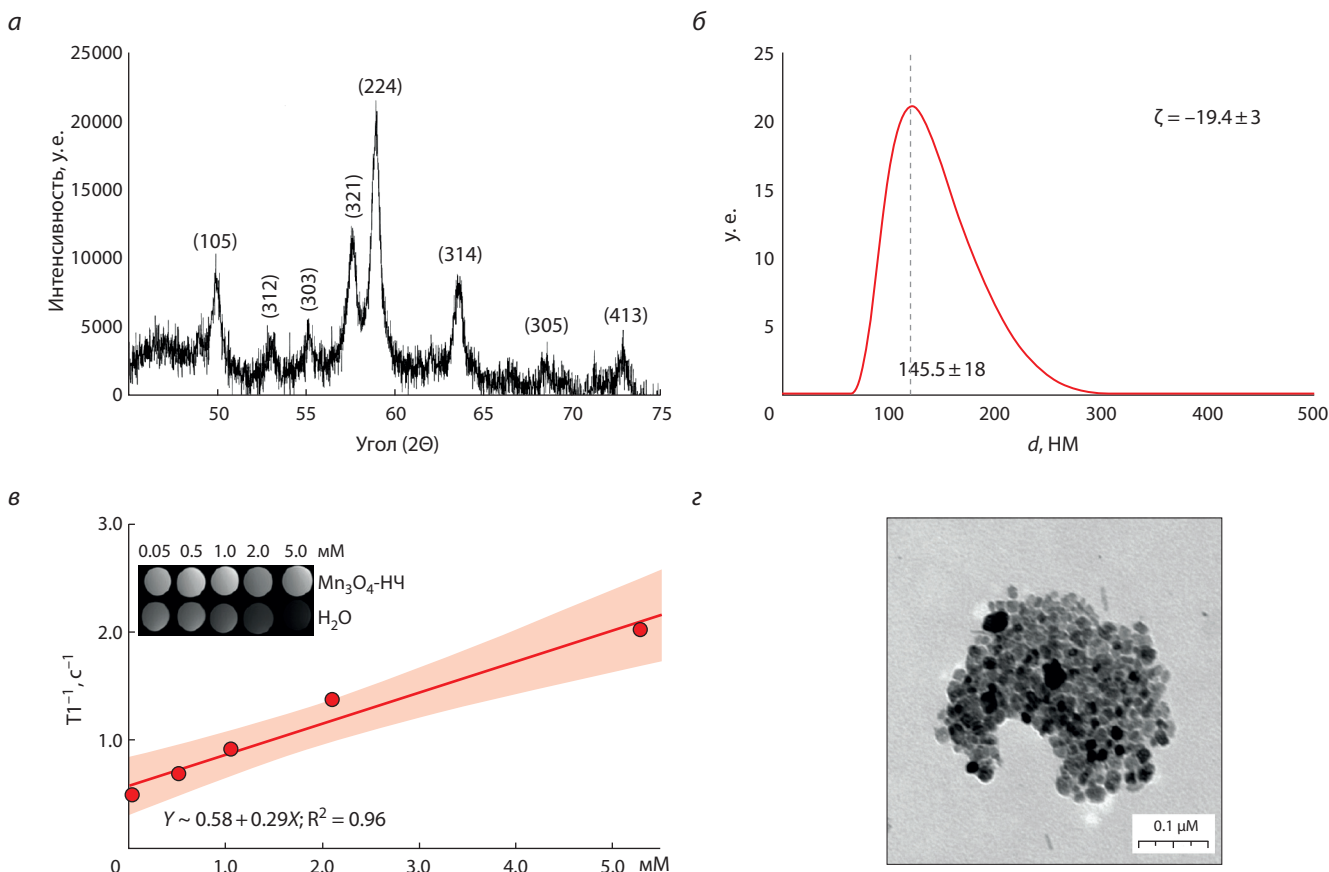


Рис. 1. Физико-химические характеристики $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$.

a – характеристика кристаллической фазы в образце $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$, исследованной методом порошковой дифрактометрии; *б* – значения гидродинамического радиуса (*d*) и дзета-потенциала (ζ) $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$, полученные методом динамического светорассеяния; *в* – зависимость обратной величины времени T_1 -релаксации от концентрации марганца в образцах $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$; *г* – фотография коллоида $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$, выполненная методом ПЭМ высокого разрешения.

контролируемых условиях, при температуре 22–26 °C, относительной влажности 30–60 % и световом режиме 14C:10T с рассветом в 01:00. Корм Ssniff (Германия) и деионизированная вода, обогащенная минеральной смесью «Северянка» (Санкт-Петербург), животным предоставлялись *at libitum*.

Наночастицы. В работе использовали коммерчески доступные наночастицы оксида марганца Mn_3O_4 ($\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$, US3340, US-NANO, США).

Структуру полученных наночастиц марганца определяли методом X-ray powder Diffraction (XRD). XRD проводился на ускорительном комплексе ВЭПП-3 при следующих параметрах синхротронного излучения: длина волны монохроматического луча $\lambda = 0.1516$ нм и диапазон углов 2θ – от 45 до 75° (рис. 1, *a*). Гидродинамический диаметр наночастиц $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$ в коллоидном растворе определяли методом динамического светорассеяния при углах рассеяния 90° и температуре 22 °C, а дзета-потенциал – с помощью электрофореза в U-образной кювете в соответствии с протоколами производителя Zetasizer NanoZS (Malvern, Англия) (см. рис. 1, *б*). Морфологию и размеры наночастиц изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Микроскоп – JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия) (см. рис. 1, *г*).

Как было показано в нашей предыдущей работе (Ромашенко и др., 2017), обратные величины релаксации (T_1^{-1} , мс^{-1} , см. рис. 1, *в*) использованных $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$ находились в прямо пропорциональной зависимости от концентрации марганца в образцах. В экспериментах *in vivo* было показано, что уровень МРТ-сигнала в обонятельных луковицах (ОЛ) через 12 ч после интраназальной аппликации $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$ прямо пропорционален концентрации марганца в образце (Ромашенко и др., 2017). Для калибровки были взяты именно ОЛ, так как концентрация наночастиц в этой структуре при интраназальном или ингаляционном введении максимальна (Moshkin et al., 2014). Ранее мы продемонстрировали низкую растворимость $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$ при различных pH в биологических средах, что дало нам основание рассматривать наблюдаемые изменения МРТ-сигнала в структурах мозга мыши после интраназального/внутривенного введений $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$ как следствие накопления в нервной ткани нерастворимых форм марганца, а не Mn^{2+} (Ромашенко и др., 2017). Это позволило использовать уровень T_1 -взвешенного МРТ-сигнала для оценки накопления НЧ в ткани.

Схема экспериментов. При исследовании накопления наночастиц марганца в структурах мозга ненаркотизированным мышам вводили по 10 $\mu\text{л}$ коллоидного раствора частиц (5.5 мг/мл) в одну ноздрю или 100 $\mu\text{л}$ $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-НЧ}$

внутривенно. Непосредственно перед использованием НЧ диспергировали в течение 1 мин на ультразвуковом гомогенизаторе при частоте 20 кГц и мощности 300 Вт. В пилотных экспериментах показано, что значения МРТ-сигнала в ОЭ и ОЛ достигают своего максимума как при внутривенном, так и при интраназальном введении через 12 ч после предоставления НЧ. Для определения паттернов накопления Mn_3O_4 -НЧ МРТ-сканирование мозга мыши проводили два раза: 24 ч до и 12 ч после введения. Сравнение полученных значений МРТ-сигнала до и после предъявления НЧ давало возможность оценить достоверность накопления марганца в той или иной структуре.

Для исследования роли ольфакторных нейронов в захвате и транспорте наночастиц марганца мышам до интраназального/внутривенного введения наночастиц в каждую ноздрю апплицировали по 10 мкл раствора следующих соединений:

- хлорпромазин (C8138 SIGMA, Sigma-Aldrich) – специфический ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза (Wang et al., 1993; Boucrot et al., 2015), препарат вводили в дозе 0.4 мг/кг;
- метил- β -циклодекстрин (332615 SIGMA, Sigma-Aldrich) – разрушает липидные рафты (Brownell et al., 2011), участвующие в захвате веществ клетками эндотелия, препарат вводили в дозе 0.4 мг/кг;
- хлорид цинка (229997 SIGMA, Sigma-Aldrich) – индуктор гибели клеток ольфакторного эпителия (Burd, 1993), препарат вводили в дозе 20 мг/кг;
- колхицин (C9754 SIGMA, Sigma-Aldrich) – соединение, подавляющее полимеризацию тубулина, эндоцитоз и клеточный транспорт (Castel, 1990), препарат вводили в дозе 0.2 мг/кг.

Для каждого вещества было протестировано по восемь животных. Колхицин и хлорпромазин вводили за 20 мин, а раствор хлорида цинка – за 24 ч до интраназальной

аппликации Mn_3O_4 -НЧ, что обусловлено скоростью наступления эффекта используемого вещества.

МРТ-исследования. Накопление магнитоконтрастных наночастиц в структурах мозга мыши было исследовано с помощью МРТ на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл. МРТ-сканирование и последующая обработка полученных изображений проводились в соответствии с ранее разработанными протоколами (Ромашенко и др., 2017).

Статистика. Для сравнения двух средних использовали U-критерий Манна–Уитни. Множественные сравнения средних проводили с помощью LSD-теста (Least Significant Difference). Данные выражали как средние $\pm$ SE.

Результаты

Для анализа паттернов распределения наночастиц при двух способах их введения были выбраны структуры мозга мыши, в которых уровень МРТ-сигнала через 12 ч после введения был выше, чем у интактных животных (рис. 2, а). В обеих группах инъекция Mn_3O_4 -НЧ приводила к статистически значимому увеличению МРТ-сигнала в ольфакторной луковице (ОЛ) и ольфакторном эпителии (ОЭ) (см. рис. 2, б). И при интраназальном, и при внутривенном введении Mn_3O_4 -НЧ максимальный уровень сигнала наблюдался в ОЛ (см. рис. 2). Уровень МРТ-сигнала в ОЭ и ОЛ при введении Mn_3O_4 -НЧ в носовую полость был выше, чем в вену, а в зубчатой извилине гиппокампа (ЗИ) достоверное накопление марганца удалось зарегистрировать только при введении Mn_3O_4 -НЧ в вену (см. рис. 2, б).

Таким образом, накопление Mn_3O_4 -НЧ при их введении в кровь или аппликации в носовую полость ограничивалось преимущественно структурами ольфакторной системы (см. рис. 2), что поставило вопрос о роли ольфакторного эпителия в проникновении наночастиц в мозг как

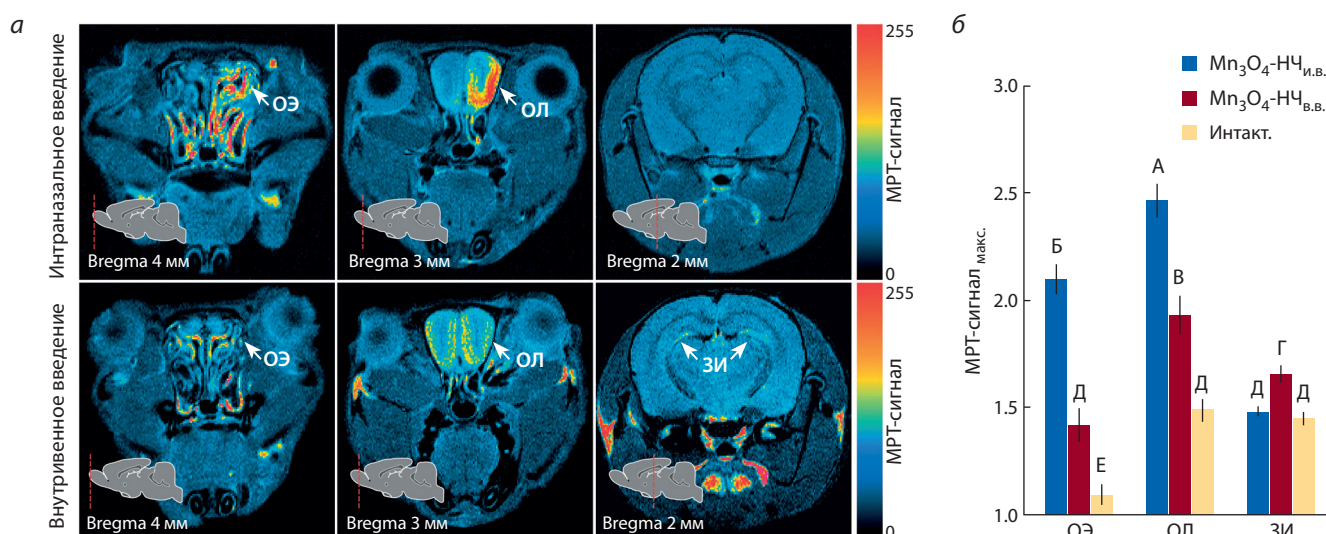


Рис. 2. Паттерны накопления Mn_3O_4 -НЧ в ольфакторных луковицах (ОЛ), ольфакторном эпителии (ОЭ) и зубчатой извилине (ЗИ) при их интраназальном (а, верхняя панель) и внутривенном (а, нижняя панель) введении.

Белыми стрелками обозначены места гиперинтенсивности, соответствующие накоплению Mn_3O_4 -НЧ. Для визуализации паттернов накопления частиц марганца на МРТ-скане было использовано псевдоокрашивание; б – количественная оценка изменения уровня МРТ-сигнала в ОЛ, ОЭ и ЗИ через 12 ч после интраназального (и.н.)/внутривенного (и.в.) введения Mn_3O_4 -НЧ. Для оценки накопления наночастиц в структуре использовали нормализованный относительно референса МРТ-сигнал. Интакт – усредненные значения МРТ-сигнала в ОЛ, ОЭ и ЗИ у животных до интраназального/внутривенного введения НЧ; б – А–Е – достоверность отличий средних значений (LSD-тест, $p < 0.05$).

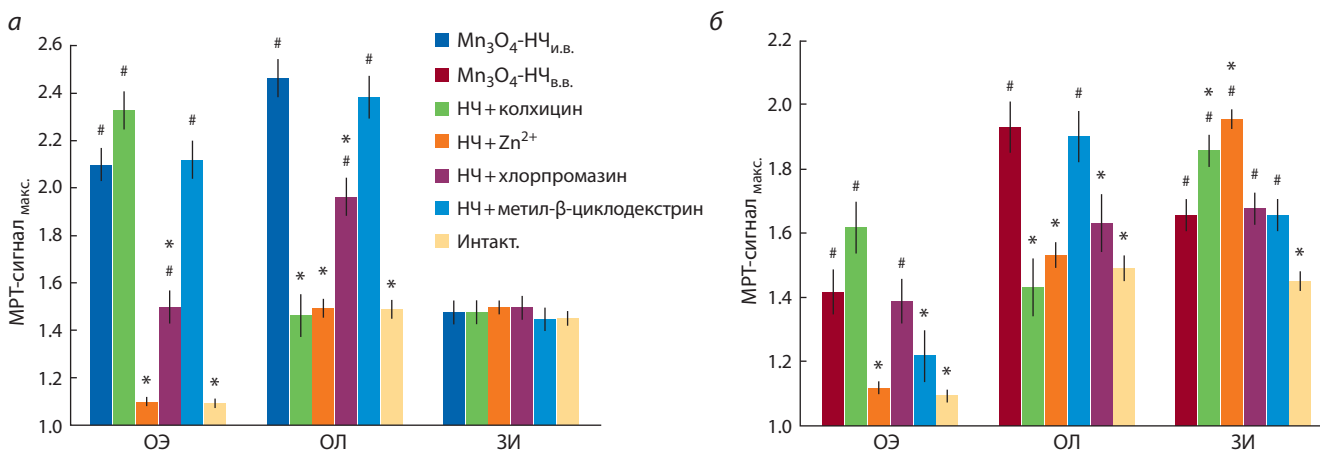


Рис. 3. Влияние интраназальной аппликации ингибиторов эндоцитоза и аксонального транспорта на накопление Mn_3O_4 -НЧ в ольфакторных луковицах (ОЛ), ольфакторном эпителии (ОЭ) и зубчатой извили (ЗИ) мыши через 12 ч после их введения в носовую полость (а) или кровеносное русло (б).

Для оценки накопления наночастиц в структуре использовали нормализованный относительно референса МРТ-сигнал. Интакт. – усредненные значения МРТ-сигнала в ОЛ, ОЭ и ЗИ у животных до интраназального/внутривенного введения НЧ. * – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, которой вводили только НЧ (U-тест Манна–Уитни, $p < 0.05$); # – достоверные отличия по сравнению с интактными животными, до введения НЧ (U-тест Манна–Уитни, $p < 0.05$).

из носовой полости, так и из сосудистого русла. Исходя из данных литературы, наиболее вероятным механизмом проникновения наночастиц из носовой полости в мозг является их захват ольфакторными нейронами с помощью эндоцитоза и последующий аксональный транспорт в гломерулярный слой ОЛ, где они пересекают синаптический контакт и переходят в митральные клетки ОЛ. Мы предположили, что при внутривенном введении, как и при интраназальном, Mn_3O_4 -НЧ накапливаются в клетках ольфакторного эпителия, откуда с помощью аксонального транспорта проникают в нейроны ОЛ. Для проверки этой гипотезы использовали ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза (хлорпромазин), ингибитор аксонального транспорта (колхицин), вещество, разрушающее липидные рафты, участвующие в захвате веществ клетками эндотелия (метил-β-циклодекстрин) (András et al., 2012), и индуктор гибели клеток ольфакторного эпителия (раствор хлорида цинка). Как индуктор гибели клеток ОЭ, так и ингибитор аксонального транспорта при их предварительной интраназальной аппликации практически полностью предотвращали накопление Mn_3O_4 -НЧ в ОЛ (рис. 3). Ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза, введенный в носовую полость, снижал накопление Mn_3O_4 -НЧ в ОЭ и ОЛ только при их интраназальном предъявлении. Интраназальное введение метил-β-циклодекстрина достоверно снижало накопление Mn_3O_4 -НЧ в ОЭ и ОЛ только при внутривенном введении НЧ. Ни один из апплицированных в нос ингибиторов не оказал значимого влияния на уровень МРТ-сигнала в зубчатой извилине (см. рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о значимой роли ольфакторного транспорта в проникновении и распространении наночастиц в пределах обонятельного тракта как с поверхности носовой полости, так и из кровяного русла.

Обсуждение

В настоящей работе мы исследовали паттерны накопления Mn_3O_4 -НЧ в структурах мозга мыши при их внутривен-

ном и интраназальном предъявлении. Наличие марганца в тканях мозга проявляется в усилении сигнала на T1-взвешенных МРТ-изображениях, величина которого напрямую зависит от концентрации марганца в ткани (Lin, Koretsky, 1997). В частности, микроэлементный анализ ОЛ, выделенных у мышей сразу после МРТ-исследования, показал близкий к единице коэффициент корреляции между интенсивностью томографического сигнала и содержанием Мп в ткани (Ромашенко и др., 2017). Все это дает основание рассматривать значения МРТ-сигнала как полуколичественный показатель насыщения марганцем тканей мозга. Используемые в работе частицы практически нерастворимы в крови и слабо растворимы при pH, соответствующей кислой среде лизосом (Ромашенко и др., 2017). Поэтому паттерны МРТ-контраста, зарегистрированные в первые 12 ч после введения Mn_3O_4 -НЧ, можно рассматривать как результат накопления наночастиц, не ионов марганца (II), которые, будучи агонистами кальциевых каналов, способны проникать во внутриклеточное пространство (Lin, Koretsky, 1997). Используемые нами Mn_3O_4 -НЧ имели достаточно большой гидродинамический радиус (~130 нм), что, по всей видимости, ограничивало их способность преодолевать ГЭБ. Поэтому при внутривенном введении Mn_3O_4 -НЧ мы наблюдали локализованный, а не распределенный характер их накопления и статистически значимое увеличение МРТ-сигнала, ассоциированное с накоплением частиц, обнаружили только в ОЭ, ОЛ и зубчатой извилине гиппокампа. Схожие паттерны накопления наблюдались при аппликации Mn_3O_4 -НЧ интраназально. Исходя из уровня МРТ-сигнала, наибольшая концентрация частиц в случае их инъекции в кровяное русло или носовую полость была в ОЛ и ОЭ. При этом в обоих случаях уровень МРТ-сигнала в ОЛ был достоверно больше по сравнению с ОЭ, что может объясняться особенностями анатомии ОЛ. Каждая глобула в ОЛ иннервируется несколькими нейронами ОЭ (Dhuria et al., 2010), что может приводить

к «концентрированию» контраста. Совпадение паттернов накопления при двух типах введения частиц натолкнуло нас на мысль, что в обоих случаях важную роль в проникновении наночастиц в мозг играет ольфакторный транспорт, который, исходя из данных литературы, вероятнее всего, осуществляется за счет эндоцитоза частиц клетками назального эпителия и их последующим аксональным транспортом (Mori et al., 1995; Dhuria et al., 2010; Munster et al., 2012; Hopkins et al., 2014; John et al., 2014).

Для проверки сформулированной в результате анализа паттернов накопления частиц гипотезы мы провели оценку роли клеток ольфакторного эпителия в накоплении частиц в ОЛ при их внутривенном и интраназальном введении. Ранее было показано, что уже через сутки после интраназального предьявления растворы солей цинка (5 %) вызывают гибель клеток ОЭ (Burd, 1993). В наших экспериментах предварительное (за 24 ч) введение раствора хлорида цинка привело к практически полной отмене накопления МРТ-сигнала в ОЛ. Последующие эксперименты с предоставлением колхицина, ингибирующего аксональный транспорт (Ribak et al., 1978), подтвердили предположение о ведущей роли ольфакторных нейронов в накоплении Mn_3O_4 -НЧ в ОЛ при обоих типах введения. При этом эксперименты с введением хлорпромазина, специфического ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза (Wang et al., 1993), и метил- β -циклодекстрина, ингибитора липидных рафтов (András et al., 2012), продемонстрировали различия в механизмах захвата НЧ из носовой полости и кровеносного русла.

Аппликация ингибиторов никак не отразилась на накоплении Mn_3O_4 -НЧ в зубчатой извилине гиппокампа. Статистически значимое увеличение МРТ-сигнала в этой структуре при внутривенном введении Mn_3O_4 -НЧ может быть связано с характерным для данной области активным нейрогенезом, который требует дополнительных как структурных (мембрана), так и энергетических ресурсов, что может интенсифицировать процессы захвата веществ из кровяного русла, в том числе и путем эндоцитоза. В свою очередь, это может увеличивать вероятность проникновения наночастиц.

Заключение

В результате проведенного исследования нам удалось показать значимый вклад аксонального транспорта в поступлении наночастиц в головной мозг как из носовой полости, так и из сосудистого русла. Это объясняет накопление в мозге субмикронных частиц различной природы (не нейротропные вирусы, нерастворимые ксенобиотики и др.), которые не способны преодолевать ГЭБ. Полученные результаты будут полезны как для понимания патогенеза различных нейродегенеративных заболеваний, так и для исследования побочных эффектов терапевтических препаратов, вводимых внутривенно.

Список литературы / References

Ромашенко А.В., Петровский Д.В., Шарапова М.Б., Мошкин Ю.М., Купер К.Э., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Мошкин М.П. Эффективность ольфакторного транспорта аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305

- [Romashchenko A.V., Petrovskii D.V., Sharapova M.B., Moshkin Y.M., Kuper K.E., Morozova K.N., Kiseleva E.V., Moshkin M.P. Olfactory transport efficiency of the amorphous and crystalline manganese oxide nanoparticles. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305. (in Russian)]
- András I.E., Eum S.Y., Toborek M. Lipid rafts and functional caveolae regulate HIV-induced amyloid beta accumulation in brain endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012;421(2):177-183. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.03.128.
- Astic L., Saucier D., Coulon P., Lafay F., Flamand A. The CVS strain of rabies virus as transneuronal tracer in the olfactory system of mice. Brain Res. 1993;619(1):146-156. DOI 10.1016/0006-8993(93)91606-S.
- Boucrot E., Ferreira A.P., Almeida-Souza L., Debar S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnet N., McMahon H.T. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. Nature. 2015;517(7535):460-465. DOI 10.1038/nature14067.
- Brook R.D., Bard R.L., Burnett R.T., Shin H.H., Vette A., Croghan C., Phillips M., Rodes C., Thornburg J., Williams R. Differences in blood pressure and vascular responses associated with ambient fine particulate matter exposures measured at the personal versus community level. J. Occup. Environ. Med. 2010;68:224-230. DOI 10.1136/oem.2009.053991.
- Brownell W.E., Jacob S., Hakizimana P., Ulfendahl M., Fridberger A. Membrane cholesterol modulates cochlear electromechanics. Pflügers Arch. 2011;461(6):677-686. DOI 10.1007/s00424-011-0942-5.
- Burd G.D. Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. Microsc. Res. Tech. 1993;24(3):195-213. DOI 10.1002/jemt.1070240302.
- Castel M.N., Malgouris C., Blanchard J.C., Laduron P.M. Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat. Neuroscience. 1990;36(2):425-430. DOI 10.1016/0306-4522(90)90438-A.
- Chen H., Kwong J.C., Copes R., Tu K., Villeneuve P.J., Van Donkelaar A., Hystad P., Martin R.V., Murray B.J., Wilton A.S. Living near major roads and the incidence of dementia, Parkinson's disease, and multiple sclerosis: a population-based cohort study. Lancet. 2017;389(10070):718-726. DOI 10.1016/S0140-6736(16)32399-6.
- Chen Z., Meng H., Xing G., Yuan H., Zhao F., Liu R., Chang X., Gao X., Wang T., Jia G., Ye C., Chai Z., Zhao Y. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO_2 nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population. Environ. Sci. Technol. 2008;42(23):8985-8992. DOI 10.1021/es800975u.
- Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. J. Pharm. Sci. 2010;99(4):1654-1673. DOI 10.1002/jps.21924.
- Donaldson K., Brown D., Clouter A., Duffin R., MacNee W., Renwick L., Tran L., Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. J. Aerosol Med. 2002;15(2):213-220. DOI 10.1089/089426802320282338.
- Hopkins L.E., Patchin E.S., Chiu P.L., Brandenberger C., Smiley-Jewell S., Pinkerton K.E. Nose-to-brain transport of aerosolised quantum dots following acute exposure. Nanotoxicology. 2014;8(8):885-893. DOI 10.3109/17435390.2013.842267.
- John J.A.S., Ekberg J.A., Dando S.J., Meedeniya A.C., Horton R.E., Batzloff M., Owen S.J., Holt S., Peak I.R., Mackay-Sim A. *Burkholderia pseudomallei* penetrates the brain via destruction of the olfactory and trigeminal nerves: implications for the pathogenesis of neurological melioidosis. MBio. 2014;5(2):e00025-14. DOI 10.1128/mBio.00025-14.
- Kampfthar T., Maisey A., Ying Z., Shah Z., Deiluiis J.A., Xu X., Kherada N., Brook R.D., Reddy K.M., Parthasarathy S., Chen L.C., Moffatt-Bruce S., Sun Q., Morawietz H., Rajagopalan S. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. Circ. Res. 2011;108(6):716-726. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.110.237560.

- Kennedy P.G.E., Chaudhuri A. Herpes simplex encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2002;73:237-238. DOI 10.1136/jnnp.73.3.237.
- Khlebtsov N., Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Chem. Soc. Rev.* 2011;40(3):1647-1671. DOI 10.1039/C0CS00018C.
- Kreyling W.G. Discovery of unique and ENM-specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016;299:41-46. DOI 10.1016/j.taap.2016.02.004.
- Lin Y.J., Koretsky A.P. Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: An approach to direct imaging of brain function. *Magn. Reson. Med.* 1997;38(3):378-388. DOI 10.1002/mrm.1910380305.
- Mistry A., Glud S.Z., Kijms J., Randel J., Howard K.A., Stolnik S., Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J. Drug Target.* 2009;17(7):543-552. DOI 10.1080/1061186090305547.
- Mori I., Komatsu T., Takeuchi K., Nakakuki K., Sudo M., Kimura Y. Parainfluenza virus type 1 infects olfactory neurons and establishes long-term persistence in the nerve tissue. *J. Gen. Virol.* 1995;76(5):1251-1254. DOI 10.1099/0022-1317-76-5-1251.
- Mori I., Nishiyama Y., Yokochi T., Kimura Y. Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. *Rev. Med. Virol.* 2004;14(4):209-216. DOI 10.1002/rmv.426.
- Mori I., Nishiyama Y., Yokochi T., Kimura Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J. Neurovirol.* 2005;11(2):129-137. DOI 10.1080/13550280590922793.
- Moshkin M.P., Petrovski D.V., Akulov A.E., Romashchenko A.V., Gerlinskaya L.A., Ganimedov V.L., Muchnaya M.I., Sadovsky A.S., Koptuyug I.V., Savelov A.A., Troitsky S.Y. Nasal aerodynamics protects brain and lung from inhaled dust in subterranean diggers, *Ellobius talpinus*. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2014;281(1792):919. DOI 10.1098/rspb.2014.0919.
- Munster V.J., Prescott J.B., Bushmaker T., Long D., Rosenke R., Thomas T., Scott D., Fischer E.R., Feldmann H., De Wit E. Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route. *Sci. Rep.* 2012;2:736. DOI 10.1038/srep00736.
- Ribak C.E., Vaughn J.E., Saito K. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 1978;140(2):315-332. DOI 10.1016/0006-8993(78)90463-8.
- Sauder C., Staeheli P. Rat model of Borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J. Virol.* 2003;77(23):12886-12890. DOI 10.1128/JVI.77.23.12886-12890.2003.
- Tanaka H., Park C.H., Ninomiya A., Ozaki H., Takada A., Umemura T., Kida H. Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet. Microbiol.* 2003;95(1):1-13. DOI 10.1016/S0378-1135(03)00132-9.
- Tranfield E.M., Walker D.C. Understanding human illness and death following exposure to particulate matter air pollution. *Environmental Health-Emerging Issues and Practice*. IntechOpen, 2012. DOI 10.5772/30264.
- Wang L.H., Rothberg K.G., Anderson R.G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* 1993;123(5):1107-1117. DOI 10.1083/jcb.123.5.1107.
- Zanusso G., Ferrari S., Cardone F., Zampieri P., Gelati M., Fiorini M., Farinazzo A., Gardiman M., Cavallaro T., Bentivoglio M., Righetti P.G. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(8):711-719. DOI 10.1056/NEJMoa022043.

ORCID ID

A.V. Romashchenko orcid.org/0000-0002-0674-0574
D.V. Petrovskii orcid.org/0000-0002-0623-0363

Благодарности. Исследования поддержаны грантом Российского научного фонда (№ 17-74-10081) и выполнены с использованием оборудования ЦКП, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.03.2019. После доработки 16.04.2019. Принята к публикации 16.04.2019.

Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров

К.С. Пантюх¹, И.В. Рукин¹, С.М. Портнов¹, А. Хатиб², С.Л. Пантелеев³, А.М. Мазур¹ 

¹ ООО «Мой Ген», Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ООО «Ион Сервис», Москва, Россия

 e-mail: alexander.mazur@genoanalytica.ru

В странах с развитым животноводством в последнее десятилетие активно происходит интеграция наукоемких технологий в племенное животноводство. В первую очередь речь идет о репродуктивных технологиях (ЭКО) и геномных технологиях (оценка носительства летальных гаплотипов и геномная оценка племенной ценности). Комбинирование репродуктивных и геномных технологий – перспективный подход, который позволит получать племенной скот высокого качества в кратчайшие сроки. В основе предлагаемой технологии ускоренного воспроизводства высокоценного племенного скота лежит получение информации о геноме эмбриона для проведения геномной оценки. Так как необходимо сохранить эмбрион живым, то количество генетического материала, который можно получить для исследований, крайне ограничено. Чтобы получить ДНК высокого качества и в достаточном количестве, при проведении генотипирования на чипах вводится этап полногеномной амплификации ДНК. Основной целью работы была оценка возможности использования биоптата (бп) эмбрионов для генотипирования и предсказания носительства летальных гаплотипов на основе результатов генотипирования. Нами было получено 100 эмбрионов крупного рогатого скота, из которых удалось взять 78 биоптатов. Полученные биоптаты были использованы для проведения полногеномной амплификации и генотипирования с применением микроматрицы. Качество и количество ДНК после проведения полногеномной амплификации всех 78 образцов были удовлетворительными для дальнейшего генотипирования. Результаты генотипирования позволили провести расчет пола животного и определение статуса носительства семи основных летальных гаплотипов голштинской породы. Из 78 протестированных животных по результатам анализа генотипа были найдены 3 носителя летальных гаплотипов – HH0 (брахиспина), HH5 и HCD. Носительство летальных гаплотипов HH0 и HH5 было подтверждено тестированием мутации, влияющей на потерю фертильности (казуальной) с помощью ПЦР-анализа. Статус носительства гаплотипа HCD после тестирования казуальной мутации не был подтвержден. Отсутствие казуальной мутации HCD у животного-носителя гаплотипа HCD можно объяснить тем, что предположительным родоначальником гаплотипа HCD является бык HOCAN000000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY (год рождения – 1975), в то время как казуальная мутация, связанная с появлением заболевания, возникла в этом гаплотипе уже у его потомка, быка HOCAN0000005457798 MAUGHLIN STORM (год рождения – 1991). Полученные данные подтверждают важность тестирования казуальной мутации у животных-носителей летальных гаплотипов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот (КРС); молочное направление; племенное разведение; геномная оценка; племенные животные.

Для цитирования: Пантюх К.С., Рукин И.В., Портнов С.М., Хатиб А., Пантелеев С.Л., Мазур А.М. Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):489-495. DOI 10.18699/VJ19.518

The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos

K.S. Pantiukh¹, I.V. Rukin¹, S.M. Portnov¹, A. Khatib², S.L. Pantelev³, A.M. Mazur¹ 

¹ I Gene, LLC, Moscow, Russia

² Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russia

³ Ion Service, LLC, Moscow, Russia

 e-mail: alexander.mazur@genoanalytica.ru

The integration of high technologies into livestock production has been actively occurring in the last decade in the countries with a developed animal breeding. First of all, we are talking about reproductive technologies (IVF) and genomic technologies (general genomic evaluation of animal and genomic evaluation of breeding value). Combining reproductive and genomic technologies is a promising approach that allows receiving high-quality breeding cattle in the shortest possible time. The basis of the proposed technology for accelerated reproduction of high-value breeding cattle is to obtain information about the genome of the embryo for genomic evaluation. The amount of genetic material that can be obtained for research is extremely limited, as it is necessary to preserve the viability of the embryo. The

stage of the whole genome amplification was introduced to obtain a high quality of genetic material in a sufficient quantity. The main purpose of this work is to assess the possibility of using embryo biopsy specimens (bsp) for embryo genotyping using microarray chips and predicting the carrier status of lethal haplotypes at the embryo stage. We obtained 100 cattle embryos, of which 78 biopsy specimens were taken to analysis. For the biopsies obtained we performed the whole genome amplification. The quality and quantity of DNA for all the 78 samples after the whole genome amplification were satisfactory for further genotyping. The quality of the performed genotyping was satisfactory and allowed the assessment of lethal haplotype carriers (determining the sex of the animal and identification of the carrier status for seven Holstein lethal haplotypes). We tested 78 embryos. From the genotyping analysis, there was detected one carrier status for three lethal haplotypes, HH0 (Brachyspina), HH5, and HCD. The carrier status of HH0 and HH5 was confirmed by testing the causal mutation using PCR analysis. The carrier status for HCD has not been confirmed by casual mutation analysis. The situation in which an animal is an HCD carrier, but not the carrier of a casual mutation, can be explained. The putative ancestor of the haplotype is the bull HOCAN00000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY (year of birth is 1975), but a causal mutation associated with this disease has arisen only in his descendant HOCAN00000545798 MAUGHLIN STORM (year of birth is 1991). The results obtained confirm the importance of testing the casual mutation in the animals that are carriers of lethal haplotypes according to the genotyping data.

Key words: cattle; dairy direction; breeding; genomic evaluation; breeding animals.

For citation: Pantiukh K.S., Rukin I.V., Portnov S.M., Khatib A., Panteleev S.L., Mazur A.M. The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):489-495. DOI 10.18699/VJ19.518 (in Russian)

Введение

Основным продуктом промышленного скотоводства является цельное молоко и молочные продукты. В Российской Федерации молочные продукты относятся к группе социально значимых продуктов питания. В 2008 г. производство молока в стране составило около 32.3 млн т, а в 2015 г. надои молока уменьшились на 4.7 % – до 30.8 млн т. Сокращение производства молока происходит на фоне нехватки молока и молочных продуктов для большинства социальных групп граждан. По данным Всемирной организации здравоохранения, минимально допустимый уровень потребления молока и молочных продуктов – 359 кг в год на душу населения, однако в Российской Федерации эта цифра составляет только 249 кг. Отсутствие в стране современной независимой селекции животных в племенном молочном животноводстве – основная причина сложившейся драматической ситуации.

Увеличение промышленного производства молока возможно за счет направленной селекции племенного скота по признакам молочной продуктивности. Эффективность селекции измеряется в ежегодном генетическом прогрессе популяции племенных животных (ΔG). Генетический прогресс популяции, в свою очередь, зависит от variability признака, по которому ведется селекция, интенсивности селекции, точности оценки племенной ценности и генерационного интервала. Внедрение геномной оценки племенной ценности может улучшить три из четырех этих факторов (Boicharda et al., 2016), а именно – увеличить точность оценки племенной ценности на 40 % (по сравнению с традиционной оценкой по родителям) и в два-три раза сократить генерационный интервал – минимальное время, необходимое для получения племенного стада высокопродуктивных быков-производителей, и увеличить интенсивность селекции за счет возможности выбирать быков-производителей из большого количества животных (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007). Внедрение геномной оценки позволит увеличить ежегодный генетический прогресс популяции в три раза по сравнению с традиционной оценкой по потомству. При этом затраты на проведение геномной оценки в пересчете

на единицу генетического прогресса в сто раз меньше, чем при проведении традиционной оценки по потомству (Кузнецов, 2015).

Еще одной важной проблемой современного животноводства является снижение показателей фертильности коров. Перед тем как признаки фертильности были включены в систему селекции (вошли в состав геномного индекса племенной ценности), племенное животноводство фокусировалось на признаках продуктивности, что привело к неблагоприятному снижению репродуктивных качеств животных (Ma et al., 2018). Одним из возможных объяснений этой тенденции может быть генетический фактор, а именно: отрицательная корреляция между факторами увеличения молочной продуктивности и показателями фертильности. Быстрая и интенсивная селекция скота на увеличение молочной продуктивности, таким образом, неминуемо приводит к снижению фертильности. В последние несколько лет были определены рецессивные дефекты, связанные с потерей фертильности, которые обуславливают эмбриональную и раннюю постэмбриональную смертность в гомозиготном состоянии. Для обнаружения большинства из них использовали новый подход, разработанный P.M. VanRaden с коллегами (2011), который предполагает поиск гаплотипов, ассоциированных с казуальной мутацией среди большого количества накопленных генотипов животных. Найденные таким образом генетические дефекты получили общее название «летальные гаплотипы, связанные с потерей фертильности». Для голштинской породы на сегодняшний день известно семь летальных гаплотипов: HH1, HH2, HH3, HH4, HH5, HCD, HH0 (брахиспина). Проходит проверку еще один новый гаплотип – HH6 (Fritz et al., 2018). Статус носительства летальных гаплотипов не включается в геномную оценку племенной ценности животного. Проводить генетический мониторинг для выявления животных-носителей моногенных заболеваний и гаплотипов крайне важно. Всесторонний генетический мониторинг животных на статус носительства моногенных заболеваний, летальных гаплотипов, аллельный состав генов белков молока и других хозяйственно полезных признаков проводится в рамках геномного паспорта животного.

Возможность проводить геномную оценку племенной ценности и генетический мониторинг для жизнеспособных эмбрионов животных позволят создать систему ускоренного воспроизводства высокоценного племенного скота за счет выбора и подсадки эмбрионов с наивысшей племенной ценностью и отсутствием носительства летальных гаплотипов.

Материалы и методы

Получение эмбрионов. Для получения эмбрионов в качестве быков-отцов были предварительно отобрано 17 быков-производителей голштинской или черно-пестрой голштинизированной породной группы.

От каждого быка было получено семя объемом 250 мкл. После анализа происхождения быков-производителей, племенной ценности их предков и доступности семени от разных быков-производителей для реализации проекта было отобрано шесть быков из ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», три быка из ОАО «Московское по племенной работе» и три быка из ООО «Альга Дженетикс Раша». Спермодозы от быков транспортировались в жидком азоте в сосудах Дьюара и были предоставлены либо станцией искусственного осеменения, либо хозяйством, где производилась аспирация яичников коров-доноров.

Отбор коров-доноров проводился из голштинской популяции живых коров племенных предприятий Пермского края. Отбор потенциальных коров-доноров яйцеклеток проводили внутри выбранного хозяйства по возрасту, высокой воспроизводительной способности и их показателям продуктивности с учетом селекционного плана хозяйства. Для отбора в популяцию коров-доноров не допускаются животные, больные инфекционными заболеваниями, находящиеся в состоянии отрицательного энергетического баланса, т.е. в периоде прогрессирующей потери массы тела после отёла, чрезмерно истощенные или ожиревшие. Для получения большего количества яйцеклеток при аспирации эмбрионов от каждой коровы-донора было проведено исследование, направленное на прогнозирование эмбриопродуктивности коров-доноров эмбрионов на основании эхографической характеристики яичников.

После аспирации яичников коров-доноров осуществлялся поиск ооцитов под бинокулярной лупой после промывки аспирированной жидкости раствором буфера Дульбекко и визуально оценивалась пригодность найденного ооцита для постановки на созревание. На созревание ставились только ооциты, отвечающие следующим требованиям: ооцит должен быть жизнеспособным, содержать кумулюсные клетки, равномерно окружающие ооцит; ооплазма должна быть мелкозернистой и равномерно заполнять прозрачную оболочку; прозрачная оболочка в свою очередь должна быть однородной по толщине и округлой по форме. Отобранные ооциты необходимого качества ставились на созревание в течение 22 ч в среде IVМ. После завершения инкубации ооциты отмывали от среды IVМ и переносили в среду для оплодотворения. Сперму от быков промывали в градиенте Перколлы (45:90) и переносили в среду для оплодотворения к заранее подготовленным на предыдущем этапе для постановки на IVF ооцитам. Среду с поставленными на IVF ооцитами

инкубировали в инкубаторе для оплодотворения в течение 24 ч. После инкубации поставленные на IVF ооциты промывали троекратно и переносили в буфер для культивирования. Культивировали на планшетном инкубаторе при постоянной температуре, влажности и в регулируемой газовой среде. На 6-й день культивирования в планшетном инкубаторе проводили оценку качества полученных эмбрионов и перенос незамерзших эмбрионов высокого качества для дальнейшего осуществления биопсии. Биопсию делали на стадии бластоцисты с помощью иглы. Количество отобранных клеток трофобласта доводили до 30–50. Подсчет велся в момент движения оторванных клеток в канале биопсийной пипетки. Биоптат из полости пипетки выдавливали в приготовленную каплю буфера PBS × 2 объемом 2 мкл. Каплю, содержащую клетки эмбриотрофобласта, соединяли на дне пробирки LoBind с предварительно помещенной на дно капель буфера PBS × 2 объемом 2.5 мкл. После процедуры биопсии эмбрион переносили в среду для культивирования в индивидуальную каплю и маркировали необходимым для идентификации образом.

Контроль жизнеспособности эмбриона проводили через 8–24 ч непосредственно перед криоконсервацией. Замороженный эмбрион, кроме необходимой информации о происхождении, сохранял идентификационный номер биопсии.

Полногеномная амплификация ДНК и генотипирование. Для проведения полногеномной амплификации (ПГА) использовали метод изотермической амплификации с множественным вытеснением. Полногеномную амплификацию осуществляли с помощью набора GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (Illumina, США), согласно стандартным рекомендациям, указанным в наборе. Амплификацию проводили для 78 полученных образцов биоптата. Для каждого образца после проведения ПГА были выполнены количественная оценка ДНК на спектрофотометре NanoDrop ND1000-Technologies-Inc (Wilmington, DE, США) и качественная оценка методом гель-электрофореза. Для проведения генотипирования брали 4 мкл образца с концентрацией ДНК 50 нг/мкл и использовали микроматрицы ДНК BovineSNP50 V3 DNA Analysis BeadChip (Illumina, США), согласно инструкции к этим микроматрицам Infinium® HD Assay Ultra, Manual Experienced User Card (Part # 11328095 Rev. B, Illumina, США).

Оценка носительства летальных гаплотипов. Для последующего анализа использовали только генотипы высокого качества (процент генотипированных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) более 95 % (call rate > 95 %)). Для каждого тестируемого животного были определены статусы носительства семи основных летальных гаплотипов голштинской породы путем анализа значений аллелей на наличие полиморфизмов, входящих в гаплотип. Если по каждому ОНП, входящему в гаплотип, хотя бы один из аллелей имел значение, имеющееся в летальном гаплотипе, животное получало статус носителя летального гаплотипа. Все остальные животные получали статус неносителя летального гаплотипа.

Амплификация индивидуальных фрагментов ДНК. Все образцы были протестированы на HCD при помощи метода, описанного в (Menzi et al., 2016), с ис-

пользованием трех пар праймеров. Праймер WF отжигался на последовательности геномной ДНК *Bos taurus* 5'-GGTGACCATCCTCTCTCTGC-3', независимо от наличия делеции. Два других праймера позволяли отличить последовательность геномной ДНК с делецией и без делеции. Праймер к последовательности геномной ДНК *B. taurus* без делеции (WR) 5'-AGTGGAACCCAGCTCCATTA-3' обеспечивал амплификацию продукта размером 249 п. н., Праймер (MF) 5'-CACCTTCCGCTATTCGAGAG-3' к последовательности геномной ДНК *B. taurus* с делеции обеспечивал амплификацию продукта размером 436 п. н.

Амплификацию индивидуальных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в следующих условиях: 94 °C 3 мин; 94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 с – 35 циклов; финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Реакционная смесь содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0.4 мкл праймера HCD WF 2.5 пмоль/мкл, 0.4 мкл праймера HCD WR 2.5 пмоль/мкл, 6.2 мкл MQ H₂O. Вторая реакционная смесь объемом 10 мкл, содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0.4 мкл праймера HCD MF 2.5 пмоль/мкл, 0.4 мкл праймера HCD WR 2.5 пмоль/мкл, 6.2 мкл MQ H₂O.

Образцы тестировали на мутацию брахиспина (HN0) с помощью метода, описанного в (Charlier et al., 2012), с использованием аллель-специфической ПЦР. Для проведения анализа использовали четыре праймера. Первая пара праймеров – маркирующие вариант аллеля без делеции: прямой – Across_UP1 5'-TCACAAAAGGGTAG GAGACTACCTG-3', обратный – Across_DN1 5'-GCTTA TTGTTTACCSTTGACAGTGG-3' – обеспечивали амплификацию продукта размером 551 п. н. Вторая пара праймеров – маркирующие вариант аллеля с делецией: прямой – BY Within_F1 5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGC TCCACTG-3', обратный – BY Within_R1 5'-ATAAATAAA TAAAGCAGGATGCTGAAA-3' – обеспечивали амплификацию продукта размером 421 п. н. (Charlier et al., 2012).

Амплификацию индивидуальных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в следующих условиях: 94 °C 3 мин; 94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 с – 35 циклов; финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Первая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0.4 мкл праймера Across_UP1 2.5 пмоль/мкл, 0.4 мкл праймера BY Across_DN1 2.5 пмоль/мкл, 6.2 мкл MQ H₂O. Вторая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0.4 мкл праймера BY Within_F1 2.5 пмоль/мкл, 0.4 мкл праймера BY Within_R1 2.5 пмоль/мкл, 6.2 мкл MQ H₂O.

Все образцы были протестированы на HN5 с помощью ПЦР с использованием трех пар праймеров: прямой праймер (HN5_F) отжигался на последовательности геномной ДНК *B. taurus*, независимо от наличия мутации 5'-AGATATGCTAAAGTTTACCTAGAAAGAA-3', и два праймера, позволяющих отличить последовательность, содержащую делецию и не содержащую ее. Праймер к последовательности геномной ДНК *B. taurus* без делеции (HN5_WT_R) 5'-CTGAAGCTCCATTCTGAGTCAT-3' обеспечивал амплификацию продукта размером 442 п. н., праймер к последовательности геномной ДНК *B. taurus* с делецией (HN5_Del_R) 5'-TGCTCTATGAATTTTG

TGAATGGT-3' обеспечивал амплификацию продукта размером 256 п. н.

Амплификацию индивидуальных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в следующих условиях: 94 °C 3 мин; 94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 с – 35 циклов; финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Первая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0.4 мкл праймера HN5_F 2.5 пмоль/мкл, 0.4 мкл праймера HN5_WT_R 2.5 пмоль/мкл, 6.2 мкл MQ H₂O. Вторая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0.4 мкл праймера HN5_F 2.5 пмоль/мкл, 0.4 мкл праймера HN5_Del_R 2.5 пмоль/мкл, 6.2 мкл MQ H₂O.

Анализ продуктов амплификации проводили при помощи электрофореза в 4 % TAE агарозном геле с бромидом этидия (EtBr) в течение 40 мин под напряжением 120 В, в качестве размерного маркера использовали ДНК Лэддер М-50 (ДИАЛАТ Лтд. кат. № MWM-50RL). В качестве буфера для электрофореза использовали 1 × TAE (0.04 М Trisbase, 0.02 М уксусная кислота, 0.5 М ЭДТА).

Результаты

Выбор породы животных для получения эмбрионов.

Для получения эмбрионов была выбрана голштинизированная черно-пестрая порода крупного рогатого скота (КРС). В настоящее время в мире существует более 300 пород *B. taurus* (Дуров и др., 2013). На молочное направление продуктивности приходится около 120 пород, причем наибольшее распространение получили не более 30. Самой высокопродуктивной молочной породой КРС в мире на сегодняшний день является голштинская порода (Дунин и др., 2013). Наиболее распространенные молочные породы коров в Российской Федерации – черно-пестрая, симментальская, холмогорская, красно-пестрая, голштинская, красная степная, айрширская и ярославская. Количество животных черно-пестрой породы в России приближается к 58 % от общего поголовья, наибольшее количество этих животных сосредоточено в европейской части. В племенном поголовье примерно такая же ситуация – доля племенных животных черно-пестрой породы от общего поголовья племенных животных составляет 59.2 % (939.5 тыс. голов из 1587). С учетом динамичного развития и широкого распространения этой породы на территории Российской Федерации она является лучшей среди существующих пород в России для разработки и апробирования технологии предимплантационной геномной оценки племенной ценности.

Однако из-за масштабного улучшения черно-пестрой породы быками голштинской породы у многих племенных быков доля кровности по голштинской породе превышает 50 % (Тихонова и др., 2015). Это обстоятельство говорит о высокой степени голштинизации российской черно-пестрой породы.

Выбор быков для получения эмбрионов. При оценке качества семени проводился учет концентрации сперматозоидов (количество миллионов сперматозоидов в 1 мл) и их подвижности (в %), учитывали долю прогрессивно подвижных, не прогрессивно подвижных и неподвижных сперматозоидов.

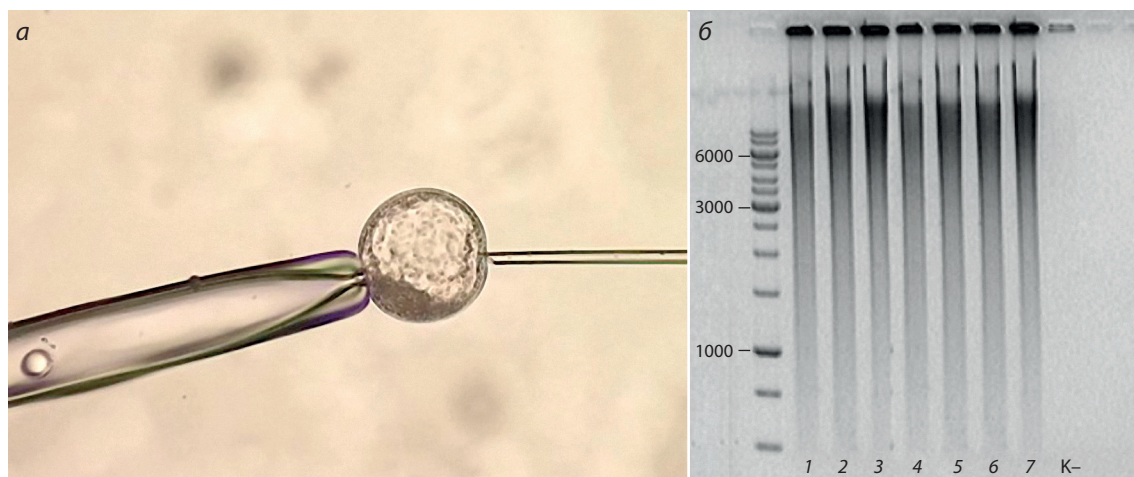


Рис. 1. Биопсия эмбриона и гель-электрофорез результатов ПГА.

а – биопсия эмбриона из третьего раунда с помощью иглы; *б* – гель-электрофорез результатов ПГА (1 % гель, 120 В, 1 ч, маркер – GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, США).

Получение эмбрионов. Было проведено пять аспираций яичников у 36 коров-доноров. В результате было получено 379 ОКК (ооцит-кумулюсный комплекс), из которых 322 было поставлено на IVM. Все ОКК после IVM были далее использованы на IVF. Из 322 ОКК после IVF было получено 100 эмбрионов, достигших стадии бластоцисты (7-й день развития эмбриона). После проведения качественного анализа 80 эмбрионов было перенесено в индивидуальные чашки Петри для дальнейшего проведения биопсии. При этом удалось получить биоптаты из 78 эмбрионов. Для всех них была проведена полногеномная амплификация ДНК (рис. 1).

Результаты генотипирования после ПГА. Средняя концентрация ДНК после проведения амплификации составляла 288.16 нг/мкл (минимальная 39.3 нг/мкл, максимальная 567.4 нг/мкл). Один из 78 образцов имел концентрацию меньше 50 нг/мкл. Концентрации ДНК после полногеномной амплификации ДНК сопоставимы с данными, полученными в подобных исследованиях (Polissen et al., 2010; Shojaei et al., 2014), и достаточны для проведения генотипирования на микроматрицах ДНК.

Генотипирование проводили на микроматрицах ДНК BovineSNP50 BeadChip V3 (Illumina, США). Все генотипы для 78 образцов были удовлетворительного качества (call rate образца > 95 %). Из 78 образцов биоптата 46 были определены как образцы мужского пола и 33 – как образцы женского пола. Распределение значений концентраций ДНК и качества генотипирования образцов показано на рис. 2.

Оценка носительства летальных гаплотипов. На первом этапе для всех 78 образцов биоптатов эмбрионов были проанализированы генотипы для поиска потенциальных носителей летальных гаплотипов. Присутствие носителей гаплотипов HH0 (брахиспина), HH5 и HCD ожидаемо с учетом того, что частота встречаемости этих гаплотипов в популяции выше, чем у остальных гаплотипов. Частота встречаемости гаплотипа HH0 (брахиспина) во французской популяции голштинского скота составляет 7.4 %. Частота встречаемости гаплотипа

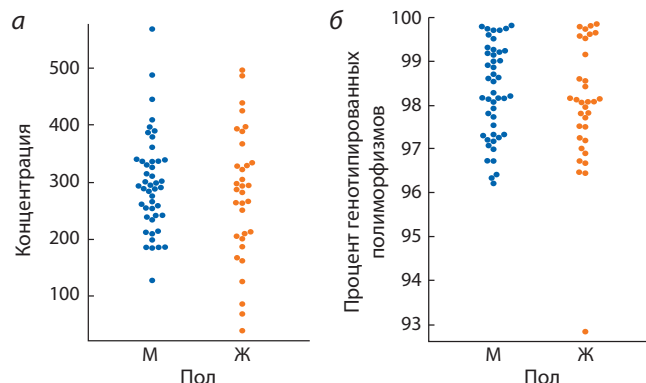


Рис. 2. Распределение значений концентраций ДНК и показателей генотипированных полиморфизмов (call rate).

а – концентрация ДНК образцов биоптата после проведения ПГА; *б* – качество генотипирования образцов биоптата после проведения ПГА.

HH5 – 3.9 % (Fritz et al., 2013), а гаплотипа HCD – 6.7 % в немецкой популяции голштинского скота (Schütz et al., 2016).

Среди 78 исследованных эмбрионов было обнаружено по одному носителю гаплотипов HH0, HH5 и HCD (бп14, бп5 и бп72 соответственно).

На втором этапе все носители летальных гаплотипов, по данным генотипирования на микроматрицах, были проанализированы на наличие казуальных мутаций, влияющих на потерю фертильности, с помощью ПЦР-анализа с последующим гель-электрофорезом. Это необходимо, так как зонды на микроматрице не содержат последовательностей ДНК для непосредственной детекции делеций, связанных с летальными гаплотипами (рис. 3).

Для подтверждения статуса носителя гаплотипа, но не казуальной мутации HCD, нами были проверены родители на носительство казуальной мутации. В качестве биологического материала были использованы волосьяной выщип матери (донора яйцеклеток) и сперма отца. Как и ожидалось, ни мать, ни отец не являлись носителями казуальной мутации (рис. 4).

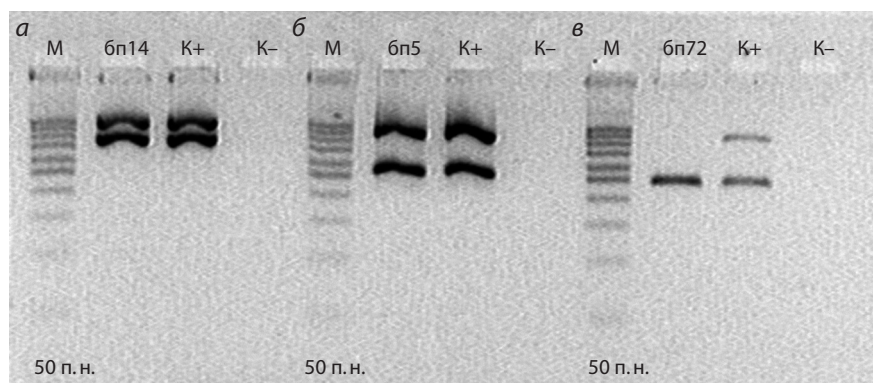


Рис. 3. Гель-электрофорез ПЦР продуктов ДНК носителей летальных гаплотипов, по данным генотипирования на микроматрице.

а – NN0 (брахиспина); б – NN5; в – HCD. М – маркер 50 п. н.; «К+» – положительный контроль; «К–» – отрицательный контроль; бп14, бп5 и бп72 – анализируемые образцы.

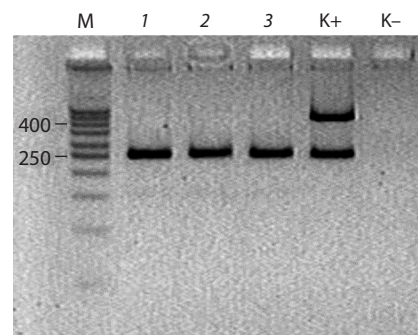


Рис. 4. Гель-электрофорез ПЦР продуктов на казуальную мутацию HCD.

1 – мать; 2 – отец; 3 – образец бп72. М – маркер 50 п. н., «К+» – положительный контроль; «К–» – отрицательный контроль.

После проведения генотипирования и анализа генотипов на наличие летальных гаплотипов образцы проверяли на наличие казуальных мутаций методом ПЦР (рис. 5).

Обсуждение

Для образцов, имеющих статус носителя казуальной мутации, по данным генотипирования на микроматрице, NN0 (брахиспина) и NN5, статус носительства подтвердился методом ПЦР. Для образца, имеющего статус носителя казуальной мутации, HCD, по данным генотипирования на микроматрице, статус носительства не подтвердился методом ПЦР (см. рис. 3).

Отсутствие казуальной мутации HCD у животного, являющегося носителем гаплотипа HCD, ожидаемо и не связано с низким качеством генотипирования (call rate генотипа составлял 96.7 %). Широкомасштабные популяционные исследования показали, что животные, гомозиготные по гаплотипу HCD, могут как иметь нарушения синтеза холестерина, так и быть полностью здоровыми. Изучение происхождения таких животных показало, что предположительным родоначальником гаплотипа HCD является бык HOCAN000000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY (год рождения – 1975), в то время как

казуальная мутация, связанная с появлением заболевания, возникла в этом гаплотипе уже у его потомка, быка HOCAN0000005457798 MAUGHLIN STORM (год рождения – 1991). Таким образом, бык HOCAN0000005457798 MAUGHLIN STORM считается родоначальником дефектного гаплотипа, и его потомки несут казуальную мутацию. Тогда как потомки быка HOCAN000000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY, в роду у которых не встречался бык HOCAN0000005457798 MAUGHLIN STORM, являются носителями гаплотипа HCD, но не казуальной мутации, вызывающей заболевание (Kipp et al., 2015; Duff et al., 2016).

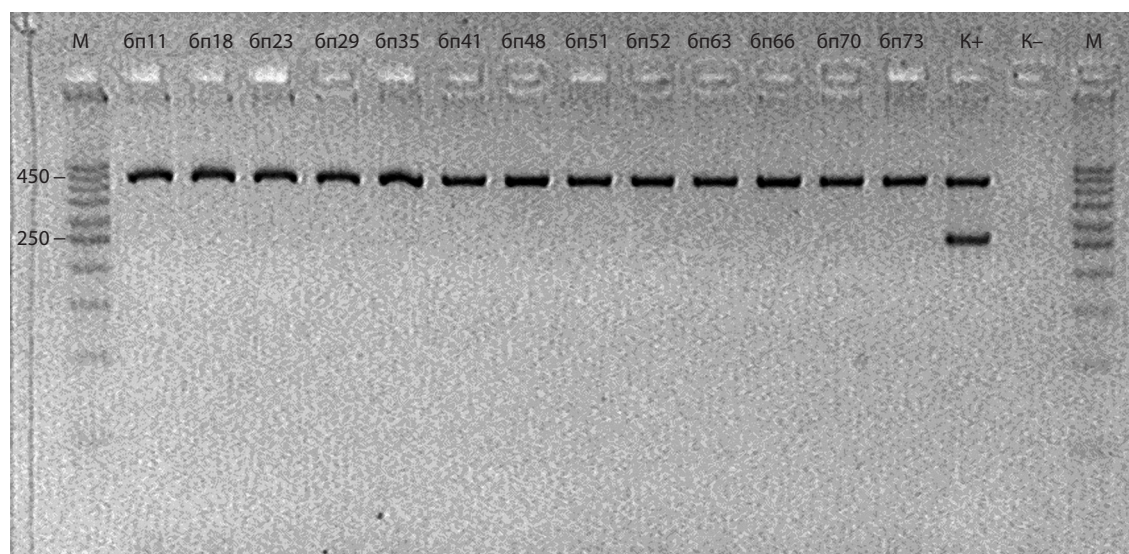


Рис. 5. Гель-электрофорез ПЦР продуктов из биоптатов после постановки ПЦР на казуальную мутацию NN5.

бп11, бп18, бп23, бп29, бп35, бп41, бп48, бп51, бп52, бп63, бп66, бп70, бп73 – анализируемые образцы. М – маркер 50 п. н.; «К+» – положительный контроль; «К–» – отрицательный контроль. По результатам ПЦР-анализа, носители казуальной мутации NN5 не были выявлены.

Заключение

Наши результаты – высокая концентрация ДНК после полногеномной амплификации и хорошее качество генотипирования – говорят о возможности генетической оценки животного еще на стадии эмбриона. Достоверность результатов, полученных на основании анализа генотипа, подтверждается молекулярно-генетическим тестированием с помощью ПЦР-анализа казуальной мутации – классическим методом для определения статуса носительства животным моногенных заболеваний и летальных гаплотипов. Показанное в настоящей работе высокое качество генотипирования генетического материала эмбриона позволяет предположить возможность расчета геномной оценки племенной ценности на основании генотипов, полученных с использованием данной методики. Однако это утверждение требует проведения дальнейших исследований. Эмбрионы, от которых был взят и проанализирован генетический материал, были подсажены суррогатным матерям. После рождения животных планируются дальнейшие работы по проверке результатов анализа эмбрионов (пол, статус носительства моногенных заболеваний), проведение повторного генотипирования животных для сравнения генотипов из биоптата на этапе эмбриона и после рождения животного и расчет племенной ценности животных.

Список литературы / References

- Дунин И.М., Аджибеков К.К., Лозовая Г.С., Чекушкин А.М. Краснопестрая порода крупного рогатого скота и перспективы ее разведения. *Farm Animals*. 2013;1:56-61.
[Dunin I.M., Adzhibekov K.K., Lozovaya G.S., Chekushkin A.M. Red-pied of dairy cattle in Russia. *Farm Animals*. 2013;1:56-61. (in Russian)]
- Дуров А.С., Гамарник Н.Г., Деева В.С. Оценка быков-производителей в популяции симментальской породы, разводимой в условиях Хакасии. *Вестн. Алт. гос. агр. ун-та*, 2013;1:79-85.
[Durov A.S., Gamarnik N.G., Deeva V.S. Assessment of stud bulls in the population of the Simmental breed bred in the conditions of Khakassia. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta* = *Bulletin of the Altai State Agricultural University*. 2013;1:79-85. (in Russian)]
- Кузнецов В.М. Исторические тренды в молочном скотоводстве России и США. Киров: НИИСХ Северо-Востока, 2015.
[Kuznetsov V.M. Historical Trends in Dairy Cattle Breeding in Russia and the USA. *Kirov: North-East Research Institute of Agriculture Publ.*, 2015. (in Russian)]
- Тихонова Т.Н., Жаров И.Н., Никитина С.В. ..., Харитонов С.Н., Сацук В.Ф., Ковалюк Н.В. Генетические ресурсы ОАО «Московское» по племенной работе. 3-е изд., М. 2015;12.
[Tikhonova T.N., Zharov I.N., Nikitina S.V., ..., Kharitonov S.N., Satsuk V.F., Kovalyuk N.V. Genetic Resources of Moskovskoe Enterprise for Breeding Work. Third Edition. Moscow, 2015;12. (in Russian)]
- Boichard D., Ducrocq V., Croiseau P., Fritz S. Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. *C. R. Biol.* 2016;339(7-8):274-277. DOI 10.1016/j.crv.2016.04.007.
- Charlier C., Agerholm J.S., Coppieters W., Karlskov-Mortensen P., Li W., de Jong G., Fasquelle C., Karim L., Cirera S., Cambisano N., Ahariz N., Mullaart E., Georges M., Fredholm M. A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS One*. 2012;7(8):e43085. DOI 10.1371/journal.pone.0043085.
- Duff J.P., Passant S., Wessels M., Charlier C., Hateley G., Irvine R.M. Cholesterol deficiency causing calf illthrift and diarrhoea. *Vet. Rec.* 2016;178:424-425. DOI 10.1136/vr.i2265.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2007; 4:381-427.
- Fritz S., Capitan A., Djari A., Rodriguez S.C., Barbat A., Baur A., Grohs C., Weiss B., Boussaha M., Esquerré D., Klopp C., Rocha D., Boichard D. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PLoS One*. 2013;8(6):e65550. DOI 10.1371/journal.pone.0065550.
- Fritz S., Hoze C., Rebours E., Barbat A., Bizard M., Chamberlain A., Escoufflaire C., Vander Jagt C., Boussaha M., Grohs C., Allais-Bonnet A., Philippe M., Vallée A., Amigues Y., Hayes B.J., Boichard D., Capitan A. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 2018;101:1-12. Pubmed reference: 29680649. DOI 10.3168/jds.2017-14119.
- Kipp S., Segelke D., Schierenbeck S., Reinhardt F., Reents R., Wurms C., Pausch H., Fries R., Thaller G., Tetens J., Pott J., Piechotta M., Grünberg W. A new Holstein haplotype affecting calf survival. *Interbull Bull.* 2015;49:49-53.
- Ma L., Cole J.B., Da Y., VanRaden P.M. Symposium review: Genetics, genome-wide association study, and genetic improvement of dairy fertility traits. *J. Dairy Sci.* 2018 Sep. 26. pii: S0022-0302(18)30906-8. DOI 10.3168/jds.2018-15269.
- Menzi F., Besuchet-Schmutz N., Fragnière M., Hofstetter S., Jagannathan V., Mock T., Raemy A., Studer E., Mehinagic K., Regenscheit N., Meylan M., Schmitz-Hsu F., Drögemüller C. A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. *Anim. Genet.* 2016;47(2):253-257. DOI 10.1111/age.12410.
- Polissen J., Sá W.F., Guerra Mde O., Machado M.A., Serapião R.V., Carvalho B.C., Camargo L.S., Peters V.M. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* 2010;93(3):783-788. DOI 10.1016/j.fertnstert.2008.10.023.
- Schütz E., Wehrhahn C., Wanjek M., Bortfeld R., Wemheuer W.E., Beck J., Brenig B. Correction: The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete deletion of TBF1M and cholesterol deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) insertion into the coding region of APOB. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157618. DOI 10.1371/journal.pone.0157618.
- Shojaei Saadi H.A., Vigneault C., Sargolzaei M., Gagné D., Fournier É., de Montera B., Chesnais J., Blondin P., Robert C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics*. 2014;15:889. DOI 10.1186/1471-2164-15-889.
- VanRaden P.M., Olson K.M., Null D.J., Hutchison J.L. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* 2011;94(12):6153-6161. DOI 10.3168/jds.2011-4624.

ORCID ID

K.S. Pantikh orcid.org/0000-0002-2595-0673
I.V. Rukin orcid.org/0000-0003-4093-3254
S.M. Portnov orcid.org/0000-0001-9192-6164

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации проекта по Соглашению № 14.579.21.0147 о предоставлении субсидии (уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI57917X0147).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2018. После доработки 28.03.2019. Принята к публикации 19.04.2019.

Сопряженность двух видов фенотипической изменчивости липы мелколистной

С.Г. Баранов¹, И.Е. Зыков², Д.Д. Кузнецова²

¹ Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых (ВлГУ), Владимир, Россия

² Государственный гуманитарно-технологический университет, Орехово-Зуево, Московская область, Россия

✉ e-mail: bar.serg58@gmail.com, zykov-oz@yandex.ru

Изучены свойства пяти билатерально симметричных признаков листовой пластины липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) в четырех популяциях Московской области в 2014–2017 гг. Угловой признак был исключен, так как он обладал свойством направленной асимметрии. Вместо него использован новый линейный признак: расстояние между основанием второй жилки 1-го порядка и основанием первой жилки 2-го порядка на первой жилке 1-го порядка. Популяционное различие во флуктуирующей асимметрии (ФА) было найдено только по первым двум признакам (ширина листа и расстояние между основаниями первой жилки 1-го порядка и второй жилки 2-го порядка). Наибольшая величина ФА листовой пластины была в городской среде, наименьшая – в сельской местности. Получены слабая отрицательная корреляционная связь между величиной пяти линейных признаков листовой пластины и значением ФА, а также слабая положительная корреляционная связь между величиной ФА этих параметров. Наибольшей флуктуационной изменчивостью обладал первый признак, а наибольшей пластической изменчивостью – второй признак. Установлены регрессионная зависимость флуктуационной изменчивости от пластической изменчивости ($b_1 = 0.25$; $p < 0.05$) и зависимость этих двух видов изменчивости от взаимодействия факторов времени и места сбора листовых пластин. Сделан вывод о сопряженности двух видов изменчивости – флуктуационной и пластической. Асинхронный рост, конкуренция за свет в условиях высокой солнечной активности в 2014–2016 гг. (по сравнению с аномальным летом 2017 г.) приводили к повышению ФА из-за дестабилизации механизмов роста и регуляции генной экспрессии, что способствовало снижению стабильности развития. Увеличение ФА и снижение стабильности развития в городских условиях в 2016 г. могли быть обусловлены: а) интенсивным потоком автотранспорта в весенне-летний период, б) высоким уровнем залегания грунтовых вод в этой части города и в) повышенной гидролитической кислотностью почвы.

Ключевые слова: липа мелколистная; флуктуирующая асимметрия; фенотипическая пластичность; стабильность развития; флуктуационная изменчивость.

Для цитирования: Баранов С.Г., Зыков И.Е., Кузнецова Д.Д. Сопряженность двух видов фенотипической изменчивости липы мелколистной. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):496-502. DOI 10.18699/VJ19.519

Conjugacy of two types of phenotypic variability of small-leaved linden

S.G. Baranov¹, I.E. Zykov², D.D. Kuznetsova²

¹ Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletovs (VLSU), Vladimir, Russia

² State Humanitarian Technology University, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia

✉ e-mail: bar.serg58@gmail.com, zykov-oz@yandex.ru

The properties of five bilaterally symmetrical features of the leaf blades of the small-leaved linden (*Tilia cordata* Mill.) in four populations of the Moscow Region in 2014–2017 were studied. The angle trait was excluded, because it possessed the property of directed asymmetry. Instead, a new linear trait was used: the distance between the base of the second vein of the first order and the base of the first vein of the second order on the first vein of the first order. The population difference in fluctuating asymmetry (FA) was found only in the first two traits (leaf width and distance between the bases of the first vein of the first order and the second vein of the second order). The largest value of FA was in the urban environment, the smallest was in the rural areas. A weak negative correlation was obtained between the magnitude of linear characteristics and the value of FA, as well as a weak positive correlation relationship between the values of FA in five traits. The first trait had the highest fluctuation variability, and the second one had the highest plastic variability. The regression dependence of the fluctuation variability on the plastic variability ($b_1 = 0.25$, $p < 0.05$) and the dependence of these two types of variability on the interaction of the factors “year” and “site of sampling” were revealed. Thus, the conclusion was made about the conjugacy of two types of variability: fluctuation and plastic. According to the authors, asynchronous growth, competition for light in conditions of high solar activity in 2014–2016 compared to the abnormal wet summer of 2017 led to an increase in FA due to destabilization of mechanisms of growth and regulation of gene expression, which contributed to a decrease in the stability of devel-

opment. The increase in FA and the decrease in the developmental stability in urban ambient in 2016 could be due to: a) an intensive flow of vehicles in spring and summer, b) a high level of groundwater in this part of the city and c) increased hydrolytic acidity of the soil.

Key words: small-leaved linden; fluctuating asymmetry; phenotypic plasticity; stability of development; fluctuation variability.

For citation: Baranov S.G., Zikov I.E., Kuznetsova D.D. Conjugacy of two types of phenotypic variability of small-leaved linden. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):496-502. DOI 10.18699/VJ19.519 (in Russian)

Введение

Для определения флуктуирующей асимметрии (ФА, незначительное, статистически незначимое отклонение от нуля разности величин правой и левой частей гомологичного билатерально симметричного признака) и уровня стабильности развития (СР) используются мерные или счетные билатерально симметричные признаки с широким диапазоном реакции на воздействие стресс-факторов (Palmer, Strobeck, 2003).

Наиболее распространенное мнение – повышение ФА означает снижение стабильности развития, т.е. снижение способности организма компенсировать и снижать отклонение от нормального онтогенетического развития по определенному канализирующему пути (Debat, David, 2001; Lens et al., 2002; Klingenberg, 2003, 2016).

К признакам с широким диапазоном реакции по величине ФА относятся наиболее вариабельные, т.е. генотипически изменчивые признаки, обладающие фенотипической (экологической) пластичностью. Они характерны для многих видов и, например, у липы мелколистной более выражены, чем у березы повислой, что связано с их видоспецифическими свойствами и принадлежностью этих растений к разным экологическим группам.

Для определения стабильности развития важно тестирование величины фенотипической пластичности отдельно от изменчивости, связанной с нестабильностью развития, вызываемой стресс-факторами. Известно также, что ФА выделяют в особый тип фенотипической изменчивости – флуктуационную изменчивость, зависящую от стохастических особенностей на молекулярно-генетическом уровне (Тиходеев, 2013).

Для природных популяций важными являются длительные сроки наблюдения за факторами, оказывающими влияние на изменение стабильности развития. К ним относятся особенности климата, биотопические характеристики, физико-химический статус почвы и рельеф местности. В проведенном исследовании под фенотипической пластичностью подразумевалась изменчивость величины билатеральных признаков.

В наших предыдущих работах (Баранов и др., 2015; Зыков и др., 2015) лишь для некоторых признаков установлены высокая дисперсия разности правого и левого значения ($R-L$) и статистически значимое различие в ФА в зависимости от места расположения популяции. Такими признаками были расстояние между основаниями второй и третьей жилок 2-го порядка и расстояние между окончаниями жилок. Цель настоящей работы – ответ на вопросы, насколько стабильно проявляются свойства билатеральных признаков при длительном мониторинге и как связаны два вида изменчивости. В задачи входило: установить величину изменчивости признаков в зависимости от кли-

матических условий и места расположения популяции; сравнить воздействие экологических факторов на уровень пластической и флуктуационной изменчивости.

Материалы и методы

Листовые пластины. Сбор листовых пластин проводился в течение 2014–2017 гг. в четырех популяциях липы мелколистной в генеративной стадии развития. Первая популяция находилась в центре г. Орехово-Зуево Московской области в 30 м от автозаправочной станции (АЗС) “British Petroleum” (55°48'13.8" с.ш.; 38°58'23.8" в.д.). Второе место сбора выбрано в западной части г. Орехово-Зуево в 70 м к юго-западу от территории химического завода «Карболит», выпускающего пластмассы на основе фенолформальдегидных смол, и в 30 м от автодороги, идущей параллельно территории этого предприятия (55°48'13.1" с.ш.; 38°58'23.9" в.д.). Третий район сбора (станция) находился на территории Государственного гуманитарно-технологического университета в восточной части г. Орехово-Зуево (55°47'31" с.ш.; 38°56'14" в.д.). Наконец, четвертая станция располагалась в пределах сельского поселения Давыдово Орехово-Зуевского района, в 250 м от завода по производству шин “Michelin” (55°36'9" с.ш.; 38°51'33" в.д.).

В каждой популяции листовые пластины шириной 3–4 см равномерно собирались с нижних частей крон десяти одновозрастных деревьев. Было использовано 100 листовых пластин по 10 образцов с дерева. Обработка материала проводилась в 2000 г. по стандартной методике (Захаров, Чубинишвили, 2001). Существенным дополнением был новый признак, как альтернативный угловому признаку (№ 5). Фактически, соединяя две точки ветвления жилок, он представлял отрезок секущей к измеряемому углу и опосредовано отражал величину угла между средней жилкой и первой билатеральной жилкой.

Как показали предыдущие исследования, используемый ранее угловой признак оказался неудобным для измерения из-за высокой степени кривизны первой латеральной жилки (Баранов и др., 2015; Зыков и др., 2015). Остальные признаки являлись характеристиками, традиционно используемыми для определения ФА по формуле нормирующей разности $FA = |R-L|/(R+L)$. Было проведено трехкратное измерение первого признака в случайно выбранной выборке. Стандартная ошибка ФА была равна 0.28 % от величины признака $(R+L)/2$. Такое значение стандартной ошибки (менее 1 % от размера признака) считается допустимым для статистически значимой флуктуирующей асимметрии (Palmer, Strobeck, 2003).

Методы статистической обработки. После проведения измерений данные сохранялись в таблицах Excel.

Для тестирования антисимметрии, одного из видов билатеральной асимметрии, влияющей на величину ФА, были определены значения эксцесса в выборках ($R-L$). Направленная асимметрия (НА), как доминирование одной из билатеральных сторон по величине определялась парным t -тестом $H_0: R = L$.

Для определения пластической изменчивости (PL, Пл) была использована формула: $PL = 1 - (x/X)$, где x и X соответствовали минимальному и максимальному значению величины признака листовой пластины (Bruschi et al., 2003).

Последующие методы проводились в среде STATISTICA10 (StatSoft Inc). Ими служили:

- обобщенный регрессионный анализ с учетом компонентов вариации (при определении факторов, влияющих на изменчивость);
- тест Колмогорова–Смирнова и этот же тест с поправкой Лиллиефорса (для проверки на нормальность распределения);
- тест Крускала–Уоллиса и корреляционный непараметрический анализ по Спирмену (при множественном сравнении выборок с отклонением от нормального распределения). При критериальной оценке во всех методах использовался уровень статистической значимости $\alpha = 0.05$ %.

Результаты

Первичная обработка данных. На основании теста Колмогорова–Смирнова установлено, что гистограмма выборок $|R-L|/(R+L)$, сгруппированных как по месту, так и по годам сбора, отклонялась от нормального распределения. Аналогичный результат ($p < 0.01$) получен при использовании теста с поправкой Лиллиефорса. Между величиной признака и значением ФА выявлена слабая отрицательная корреляционная связь (коэффициент Спирмена, $r = -0.06-0.13$) (табл. 1). Выделенные значения r (см. табл. 1 и 2) соответствуют $p < 0.05$.

Причиной такой зависимости, предположительно, служит конкуренция за солнечный свет, в результате чего происходят снижение стабильности развития и повышение ФА в популяции с малой поверхностью листовых пластин и, соответственно, с малой величиной гомологичных признаков (Venâncio et al., 2016). Исходя из этого, важной частью предварительного анализа была гомогенизация первичных данных. По существующим представлениям, в анализируемых популяциях средние значения билатерально симметричного признака в выборке не должны статистически различаться. В противном случае корреляционная связь между ФА и размером признака может исказить результат сравнительного анализа (Palmer, Strobeck, 2003).

Было решено произвести выбраковку высоких и низких значений в выборках, сгруппированных по категории «популяция». После выбраковки однофакторный дисперсионный анализ показал отсутствие различия в величине каждого признака среди популяций ($p < 0.05$).

Проведено изучение характера гистограмм частот величин разности ($R-L$). 69 % выборок, сгруппированных по месту и году сбора, характеризовались величиной эксцесса γ в диапазоне $0 \div 2$. 30 % выборок обладали остро-

Таблица 1. Корреляционная связь между величиной признака и ФА (коэффициенты Спирмена, r)

Признак, №	1	2	3	4	5
1	-0.05	-0.04	-0.04	-0.05	-0.02
2	-0.05	-0.13	0.05	0.01	-0.02
3	0.02	0.05	-0.04	-0.03	0.03
4	-0.03	-0.07	-0.06	-0.07	0.01
5	-0.02	-0.06	0.00	-0.08	-0.10

Примечание. Выделенные значения соответствуют $p < 0.05$.

Таблица 2. Коэффициенты парной корреляционной связи между значениями ФА (коэффициенты Спирмена, r , пять признаков)

Признак, №	1	2	3	4	5
1	1.00	0.06	0.05	-0.01	0.09
2	0.06	1.00	0.04	0.03	0.15
3	0.05	0.04	1.00	0.02	0.04
4	-0.01	0.03	0.02	1.00	0.13
5	0.09	0.15	0.04	0.13	1.00

Примечание. Выделенные значения соответствуют $p < 0.05$.

вершинным распределением со значением $\gamma = 2 \div 4$. У 10 % выборок эксцесс был меньше нуля, но не ниже -0.2 . Согласно табличным данным, полученным пермутационным размножением, критическое значение γ , указывающее на антисимметрию, равно значению $\gamma = -0.68$ ($\alpha = 0.05$; $n = 100$) (Palmer, Strobeck, 2003). Таким образом, в выборках ($R-L$), сгруппированных по месту и году сбора, проявления антисимметрии обнаружено не было.

Проверка на наличие НА в выборках ($R-L$) подтвердила присутствие ее в шести случаях в угловом признаке и в одном случае в третьем признаке (стация Карболит, 2017 г.). Эти выборки не использовались в работе, так как направленная асимметрия, как и антисимметрия, мешает определению флуктуирующей асимметрии, являющейся показателем флуктуационной изменчивости.

Вопрос об использовании признаков, обладающих скоррелированностью по величине ФА, достаточно дискуссионный. Корреляционный анализ Спирмена показал слабую положительную корреляционную связь четырех пар признаков (табл. 2).

Слабая корреляционная связь между некоторыми признаками говорила о слабой прямой зависимости между билатеральными признаками. В случае высокой корреляционной связи признаки нельзя было бы назвать независимыми. Слабая корреляционная зависимость была вполне естественной, т. е. увеличение ФА одного признака вело к увеличению ФА и в другом признаке. Например, близкие по расположению признаки № 2–5 показали сопряженную флуктуацию с коэффициентом корреляции $r = 0.09-0.15$.

Популяционная изменчивость. Тестирование популяционной изменчивости непараметрическим критерием

Крускала–Уоллиса не показало различия в средних значениях ФА ($p > 0.05$). Анализ изменчивости каждого признака выявил статистически значимое различие в первом и втором признаках (рис. 1).

Первый признак отличался в медианном тесте ($p = 0.01$), второй – как в медианном тесте ($p = 0.039$), так и в тесте Крускала–Уоллиса ($p = 0.001$). Парное сравнение показало, что популяция в пос. Давыдово отличалась от популяций в районе Государственного гуманитарно-технологического университета (ГГТУ) ($p = 0.002$) и районе АЗС “British Petroleum” ($p = 0.003$). В станции «ГГТУ» выявлена самая высокая величина ФА и, соответственно, пониженная стабильность развития.

Временная динамика изменчивости. Тест Крускала–Уоллиса показал, что статистически значимое различие во флуктуирующей асимметрии в зависимости от года сбора было характерно для признаков № 1 и 2 (рис. 2).

По другим признакам различия в ФА в течение четырех лет наблюдения не было выявлено. В дисперсионном анализе статистическое значимое различие проявлялось примерно так же, как в непараметрическом, т. е. величина ФА различалась в 2014 и 2016 гг. ($p = 0.001$). Следует отметить, что первый и второй признаки – наиболее крупные по величине, а высокая дисперсия и гетерогенность величин R и L способствовали проявлению различий в ФА. Повышенная ФА в 2014 г. может объясняться высокой температурой в мае в период формирования листовых пластинок липы (от 15 до 60 % выше нормы, по данным Гидрометцентра России).

Связь между двумя видами изменчивости. Известно, что экологическая пластичность растений обуславливается буферной емкостью морфологических структур, что позволяет им активно адаптироваться к условиям среды. Существуют разные взгляды на вопрос о связи стабильности развития и экологической пластичности. Например, есть мнение об адаптивной роли ФА и корреляции между пластичностью и стабильностью развития или их частичной корреляции (Debat, David, 2001; Klingenberg, 2003).

Для поиска связи между флуктуационной изменчивостью и пластической изменчивостью был проведен регрессионный анализ. Фактор «год сбора» использовался как фиксированный компонент вариации, фактор «место сбора» и взаимодействие «год сбора × место сбора» регистрировались как случайные факторы. Результаты показали, что на пластическую изменчивость влияли: величина ФА (1-й признак), год сбора и смешанное взаимодействие факторов: «место сбора» × «год сбора» (табл. 3).

Таким образом, наибольшее влияние на пластическую изменчивость оказывала флуктуирующая асимметрия первого мерного признака ($p = 0.004$). Климатические условия года и взаимодействие «год сбора» × «место сбора» были также существенными ($F = 11.0$ и 6.97 соответственно).

Аналогично было проведено исследование влияния пластической изменчивости, года и места сбора на флуктуационную изменчивость (табл. 4).

Пластическая изменчивость только одного – второго – признака оказывала на ФА статистически значимое влияние ($p = 0.001$). Совместное действие факторов «год сбора» × «место сбора» было существенным, как и при влиянии ФА на пластическую изменчивость ($F = 4.19$; $p = 0.0001$). График профиля в 3D пространстве позволил оценить влияние места сбора и года сбора на величину ФА и на величину пластической изменчивости (рис. 3).

Профиль зависимости показал наибольшее значение ФА в районе ГГТУ. Повышенная пластическая изменчивость наблюдалась в 2014–2015 гг. и зависела от года сбора листовых пластинок. Параметрическая оценка с помощью однофакторного дисперсионного анализа показала также статистически значимую зависимость PL от года сбора ($df = 3$; $F = 17.28$; $p = 0.000$).

Описанная связь стабильности развития и пластической изменчивости была характерна для 1-го и 2-го признаков. Основное различие в двух типах изменчивости заключалось в реакции их на факторы места и года сбора пластинок. Величина PL (пластическая изменчивость морфологических структур), существенно зависела от климатических условий года сбора, а также от сочетания этих условий со спецификой популяционной станции.

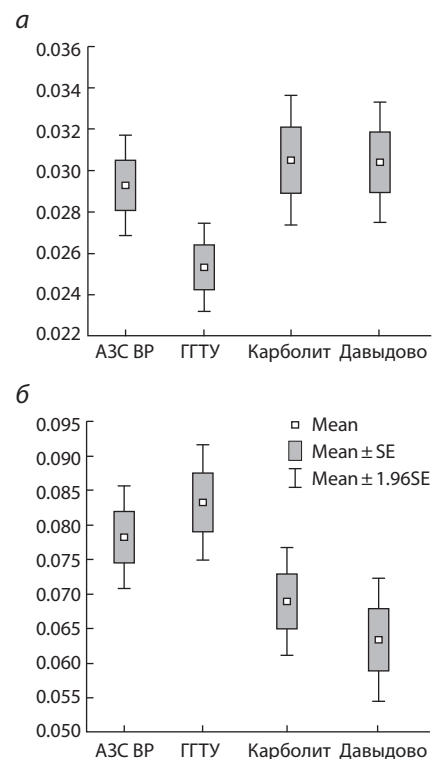


Рис. 1. Популяционное различие в величине ФА (ось ОУ): а – первый признак; б – второй признак.

Здесь и в рис. 2: Mean – среднее значение; mean ± SE – среднее значение ± стандартная ошибка; mean ± 1.96SE – среднее значение ± ± 1.96 × стандартная ошибка.

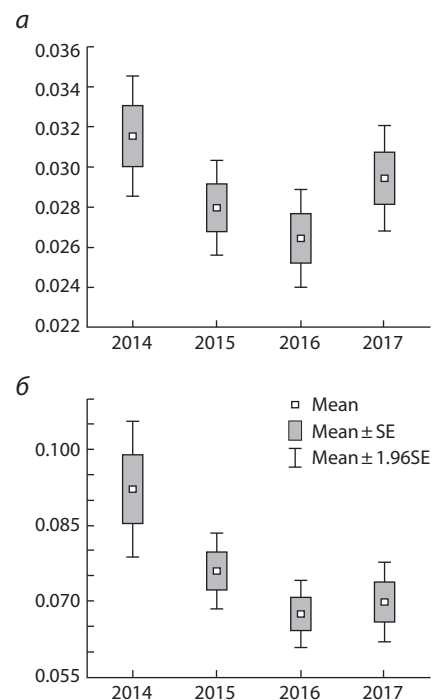


Рис. 2. Значение ФА (ось ОУ) в зависимости от года сбора листовых пластинок.

а – первый признак, $p = 0.001$; б – второй признак, $p = 0.012$.

Таблица 3. Влияние факторов стабильности развития, года сбора и места сбора на пластическую изменчивость

Источник влияния	df effect	MS effect	df error	MS error	F	p
Стабильность развития (ФА)						
Признак 1	1	38.70	31.08	3.91	9.89	0.004
Признак 2	1	6.83	18.66	4.70	1.45	0.243
Признак 3	1	0.59	174.61	2.96	0.20	0.657
Признак 4	1	8.64	98.47	3.06	2.83	0.096
Признак 5	1	0.09	37.02	3.45	0.03	0.875
Место сбора	3	10.61	8.51	37.57	0.28	0.837
Год сбора	3	238.37	6.52	21.67	11.00	0.006
Место сбора x год сбора	7	17.03	1021.00	2.44	6.97	0.0001

Примечание. Здесь и в табл. 4: df effect – эффект степени свободы; MS effect – эффект средних квадратов; df error – степень свободы ошибки; MS error – ошибка среднего квадрата; F – критерий Фишера; p – статистическая значимость.

Таблица 4. Влияние факторов пластической изменчивости, года сбора и места сбора на флуктуационную изменчивость

Источник влияния	df effect	MS effect	df error	MS error	F	p
Пластическая изменчивость						
Признак 1	1	0.002	7.170	0.001	1.996	0.200
Признак 2	1	0.012	193.963	0.001	12.333	0.001
Признак 3	1	0.002	832.745	0.001	2.143	0.144
Признак 4	1	0.001	817.463	0.001	0.643	0.423
Признак 5	1	0.004	251.019	0.001	4.337	0.038
Место сбора	3	0.003	7.382	0.004	0.627	0.619
Год сбора	3	0.001	7.634	0.004	0.324	0.808
Место сбора x год сбора	8	0.003	1092.000	0.001	4.195	0.0001

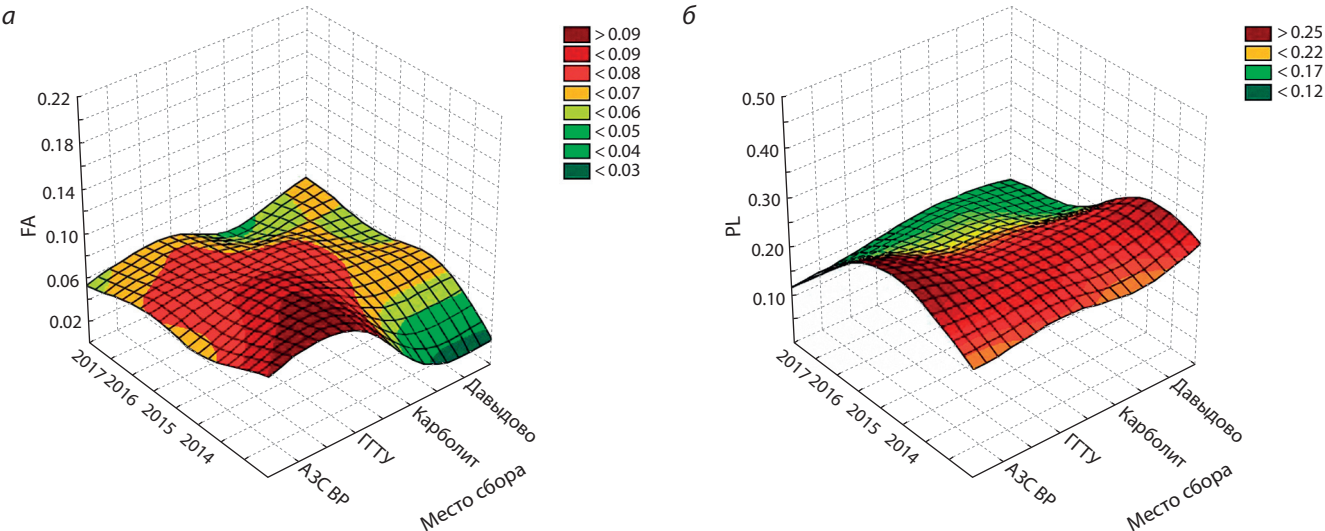


Рис. 3. Профиль зависимости флуктуирующей асимметрии (а) и пластической изменчивости (б) от года и места сбора. На вкладки: градиентный профиль FA и PL.

Стабильность развития как выражение флуктуационной изменчивости не зависела ни от расположения популяции, ни от года сбора. На стабильность развития оказывал влияние эффект взаимодействия обоих факторов. Большой пластической изменчивостью обладал признак № 2

(расстояние между основаниями жилок), он и влиял на среднее значение ФА. Наибольшей флуктуационной изменчивостью обладал признак № 1 (ширина листа), который, соответственно, оказывал влияние на пластическую изменчивость.

Множественный регрессионный анализ показал зависимость флуктуационной изменчивости от пластической изменчивости с коэффициентом регрессии $b = 0.25$ ($p < 0.05$).

Обсуждение

При работе с листовыми пластинами липы первичное инспектирование и обработка данных имели серьезное значение для получения достоверных результатов. Использование непараметрических методов оценки было оправданным, так как приемы логарифмирования не приводили к нормализации или нормализовали лишь часть выборок, так же, как и преобразование Бокса-Кокса. Угловой признак был заменен линейным, что облегчило работу по определению индекса ФА. Оба вида изменчивости, флуктуационная и пластическая, проявляли сопряженный эффект: ФА 1-го признака оказывал влияние на PL, а пластическая изменчивость 2-го признака влияла на флуктуационную изменчивость. Такой вывод представляется консенсусным, так как в литературе по этому вопросу есть мнение как об одностороннем влиянии ФА на PL (Houle, 2003; Tonsor et al., 2013; Tucić et al., 2018), так и об обратном эффекте пластической изменчивости на ФА, например в растениях *Iris pumila* (Sultan, 2003). Другими словами, признаки характеризовались сопряженностью двух видов изменчивости. Преобладание одного вида изменчивости компенсировалось другим видом, например слабая флуктуационная изменчивость признака № 2 нейтрализовалась его высокой пластической изменчивостью.

По нашему мнению, асинхронный рост, конкуренция за свет в условиях высокой солнечной активности в 2014–2016 гг. по сравнению с аномальным летом 2017 г. приводили к повышению ФА из-за дестабилизации механизмов роста и регуляции генной экспрессии, что и способствовало снижению стабильности развития в районе ГГТУ.

Оценка компонентов дисперсии пластической изменчивости показала, что эффект «года сбора» составлял 26.2 % всей дисперсии, взаимодействие факторов «год сбора» и «место сбора» – 5.1 %.

Дисперсия стабильности развития объяснялась небольшой долей дисперсии (около 2 %), включавшей вариацию PL и взаимодействие «год сбора» × «место сбора».

Увеличение ФА и снижение стабильности развития в районе ГГТУ в 2016 г. мы связываем: а) с высоким уровнем интенсивности потока автотранспорта, особенно в весенне-летний период, б) с высоким уровнем залегания грунтовых вод в этой части города и в) с повышенной гидролитической кислотностью почвы. По неопубликованным данным, в почвенных образцах пос. Давыдово и АЗС «British Petroleum» этот показатель был равен 3.1–3.8 мг × экв. Н⁺. В районе ГГТУ показатель гидролитической кислотности был значительно выше – 5.7 мг × экв. Н⁺.

Экологическая пластичность представляется как высоко гетерогенный вид изменчивости, который зависел от года сбора листьев. Аномально влажный год (трехкратное превышение нормы осадков в сравнении с 2015 г.), скорее, благоприятно повлиял на стабильность развития популяций липы мелколистной в виде снижения уровня флуктуирующей асимметрии.

Природа необъясненной доли дисперсии стабильности развития остается невыясненной, что констатируется многими авторами (Houle, 2003; Sultan, 2003; Lajus, Alekseev, 2004; Scheiner, 2014; Tucić et al., 2018). Результаты исследований, проведенных в 2004–2007 гг. в районе завода «Карболит», показали повышенную флуктуирующую асимметрию по четвертому признаку (расстояние между основаниями первой и второй жилок 1-го порядка), что указывает на высокую функциональную изменчивость признаков, отражающих стабильность развития в зависимости от источника и характера стресса (Baranov, 2014).

Заключение

Флуктуирующая асимметрия, связанная отрицательной корреляционной связью с величиной признака, проявлялась как онтогенетическая форма изменчивости и зависела от локальных и климатических факторов.

Авторы полагают, что длительный фенотипический мониторинг природных популяций с использованием набора дополнительных экологических факторов и билатерально симметричных признаков позволит более полно анализировать количественные компоненты пластической и флуктуационной изменчивости.

Список литературы / References

- Баранов С.Г., Зыков И.Е., Федорова Л.В. Изучение внутривидовой изменчивости липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) на основе билатеральной асимметрии листовых пластин. Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2015;2(30):134-145.
[Baranov S.G., Zykov I.E., Fedorova L.V. Studying *Tilia cordata* Mill. intraspecific variation on the basis of leaf bilateral asymmetry. Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal. Biology. 2015;2(30):134-145. DOI 10.17223/19988591/30/9. (in Russian)]
- Захаров В.М., Чубинишвили А.Т. Мониторинг здоровья среды на охраняемых природных территориях. М.: Центр экологической политики России, 2001.
[Zakharov V.M., Chubinishvili A.T. Monitoring of Environmental Health in Protected Natural Territories. Moscow: Center for the Environmental Policy of Russia, 2001. (in Russian)]
- Зыков И.Е., Федорова Л.В., Баранов С.Г. Оценка биоиндикационного значения уровня изменчивости параметров листовых пластинок липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) в условиях города Орехово-Зуево и Орехово-Зуевского района. Вестн. Моск. гос. обл. ун-та. Сер. Естественные науки. 2015;1:15-21.
[Zykov I.E., Fedorova L.V., Baranov S.G. Assessment of the biological value of the level of variability of the parameters of leaf blades of small-leaved linden (*Tilia cordata* Mill.) in the city of Orekhovo-Zuyevo and the Orekhovo-Zuyevo region. Vestnik Moskovskogo Gosudarstvennogo Oblastnogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki = Bulletin of the Moscow State Regional University. Ser. Natural Sciences. 2015;1:15-21. (in Russian)]
- Тиходеев О.Н. Классификация изменчивости по факторам, определяющим фенотип: традиционные взгляды и их современная ревизия. Экол. генетика. 2013;11(3):79-92.
[Tikhodeev O.N. Classification of variability forms based on phenotype determining factors: Traditional views and their revision. Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics. 2013;11(3):79-92. DOI 10.17816/ecogen11379-92. (in Russian)]
- Baranov S.G. Use of morphogeometric method for study fluctuating asymmetry in leaves *Tilia cordata* under industrial pollution. Adv. Environ. Biol. 2014;8(7):2391-2398.

- Bruschi P., Grossoni P., Bussotti F. Within- and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations. *Trees*. 2003;17(2):164-172. DOI 10.4236/oje.2013.34033.
- Debat V., David P. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.* 2001;16(10):555-561. DOI 10.1016/S0169-5347(01)02266-2.
- Houle D. A simple model of the relationship between asymmetry and developmental stability. *J. Evol. Biol.* 2000;13(4):720-730. DOI 10.1046/j.1420-9101.2000.00195.x.
- Klingenberg C.P. A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. Ed. M. Polak. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York: Oxford University Press, 2003;14-34. DOI 10.1371/journal.pone.0081824.
- Klingenberg C.P. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Dev. Genes Evol.* 2016;226(3):113-137. DOI 10.1007/s00427-016-0539-2.
- Lajus D.L., Alekseev V.R. Phenotypic variation and developmental instability of life-history traits: a theory and a case study on within-population variation of resting eggs formation in *Daphnia*. *J. Limnol.* 2004;63(Suppl. 1):37-44. DOI 10.4081/jlimnol.2004.s1.37.
- Lens L.U., Van Dongen S., Kark S., Matthysen E. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biol. Rev.* 2002;77(1):27-38. DOI 10.1017/S1464793101005796.
- Palmer A.R., Strobeck C.H. Fluctuating asymmetry analyses revisited. Ed. M. Polak. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York: Oxford University Press, 2003;279-319. DOI 10.1371/journal.pone.0034689/S1464793101005796.
- Scheiner S.M. The genetics of phenotypic plasticity. XIII. Interactions with developmental instability. *Ecol. Evol.* 2014;4(8):1347-1360. DOI 10.1002/ece3.1039.
- Sultan S.E. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evol. Dev.* 2003;5(1):25-33. DOI 10.1046/j.1525-142X.2003.03005.x.
- Tonsor S.J., Elnaccash T.W., Scheiner S.M. Developmental instability is genetically correlated with phenotypic plasticity, constraining heritability, and fitness. *Evolution*. 2013;67(10):2923-2935. DOI 10.1111/evo.12175.
- Tucić B., Budečević S., Manitašević Jovanović S., Vuleta A., Klingenberg C.P. Phenotypic plasticity in response to environmental heterogeneity contributes to fluctuating asymmetry in plants: first empirical evidence. *J. Evol. Biol.* 2018;31(2):197-210. DOI 10.1111/jeb.13207.
- Venâncio H., Estevas A.-S., Jean C.S. Leaf phenotypic variation and developmental instability in relation to different light regimes. *Acta Bot. Bras.* 2016;30(2):296-303. DOI 10.1590/0102-33062016abb0081.

ORCID ID

S.G. Baranov orcid.org/0000-0002-7778-4689
I.E. Zykov orcid.org/0000-0002-6027-3700
D.D. Kuznetsova orcid.org/0000-0001-7422-8751

Благодарности. Авторы выражают благодарность всем, оказавшим помощь в сборе и подготовке гербарного материала.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.05.2018. После доработки 09.04.2019. Принята к публикации 09.04.2019.