

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ20.647

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. Рогозин – 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)
В.С. Славин – д-р наук, проф. (США)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ20.647

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. (Agric.), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.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
N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
D. Larkin, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany
I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E. Pestsova, Dr. Sci. (Biology), Germany
L.Yu. Novikova, Cand. Sci. (Engineering), Russia
N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
E. Turuspekov, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

Генетика растений

- 549 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние разных типов стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) на комбинационную способность ЦМС-линий сорго. О.П. Кибальник, Л.А. Эльконин

- 557 **ОБЗОР**
Молекулярные маркеры в генетическом анализе скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью. И.В. Поротников, О.Ю. Антонова, О.П. Митрофанова

- 568 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изучение генетических факторов, определяющих признак «тетраостость» мягкой пшеницы. О.Б. Добровольская, А.Е. Дресвянникова, Е.Д. Бадаева, К.И. Попова, М. Травничкова, П. Мартинек

- 575 **ОБЗОР**
Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы. В.Н. Шамаков, Ю.М. Константинов

- 589 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Выявление дублетных образцов в коллекции сахарной кукурузы с использованием электрофореза зеина. В.В. Сидорова, Ю.А. Керв, А.В. Конарев

- 598 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Сравнительный анализ экспрессии генов у чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) при низкотемпературном стрессе. Л.С. Самарина, А.О. Мацькив, Н.Г. Конинская, Т.А. Симонян, В.И. Маляровская, Л.С. Малюкова

Генофонд и селекция растений

- 605 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Фенотипическое и генетическое разнообразие коллекции тетраплоидной пшеницы, выращенной в Казахстане. А. Затыбеков, Ш. Энуарбек, С. Абугалиева, Е. Туруспеков (на англ. языке)

- 613 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическое разнообразие *Raphanus sativus* L. коллекции ВИР по алюмоустойчивости. А.Б. Курина, И.А. Косарева, А.М. Артемьева

625

ОБЗОР

Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные пути использования и селекции культуры. М.А. Вишнякова, А.В. Кушнарёва, Т.В. Шеленга, Г.П. Егорова

Молекулярная и клеточная биология

636

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК, в хромосомах *Macrostomum mirumnovem* – вида, недавно прошедшего полногеномную дубликацию. К.С. Задесенец, Н.Б. Рубцов

643

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами. Г.С. Риттер, В.П. Николин, Н.А. Попова, А.С. Проскурина, П.Э. Кисаретова, О.С. Таранов, Т.Д. Дубатолова, Е.В. Долгова, Е.А. Поттер, С.С. Кирикович, Я.Р. Ефремов, С.И. Байбородин, М.В. Романенко, М.И. Мещанинова, А.Г. Веняминова, Н.А. Колчанов, С.С. Богачев

653

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

СрG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro*. А.А. Останин, О.Ю. Леплина, Е.А. Буракова, Т.В. Тыринова, А.А. Фокина, А.С. Проскурина, С.С. Богачев, Д.А. Стеценко, Е.Р. Черных

Генетика микроорганизмов

661

ОБЗОР

Пикобирнавирусы: распространенность, генетическое разнообразие, методы детекции. А.Ю. Кашников, Н.В. Епифанова, Н.А. Новикова

673

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Симбиотические бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* среди тлей (Aphidoidea). Д.А. Романов, И.А. Захаров, Е.В. Шайкевич

Plant genetics

- 549 ORIGINAL ARTICLE
Influence of different types of sterile cytoplasm (A3, A4, 9E) on the combining ability of CMS lines of sorghum. O.P. Kibalnik, L.A. Elkonin
- 557 REVIEW
Molecular markers in the genetic analysis of crossability of bread wheat with rye. I.V. Porotnikov, O.Yu. Antonova, O.P. Mitrofanova
- 568 ORIGINAL ARTICLE
The study of genetic factors that determine the awned glume trait in bread wheat. O.B. Dobrovolskaya, A.E. Dresvyannikova, E.D. Badaeva, K.I. Popova, M. Trávníčková, P. Martinek
- 575 REVIEW
Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives. V.N. Shmakov, Yu.M. Konstantinov
- 589 ORIGINAL ARTICLE
Identification of duplicate accessions in the sweet maize collection by means of zein electrophoresis. V.V. Sidorova, Yu.A. Kerv, A.V. Konarev
- 598 ORIGINAL ARTICLE
Comparative analysis of gene expression in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) under low-temperature stress. L.S. Samarina, A.O. Matskiv, N.G. Koninskaya, T.A. Simonyan, V.I. Malyarovskaya, L.S. Malyukova
- ## Plant gene pool and breeding
- 605 ORIGINAL ARTICLE
Phenotypic and genetic variability of a tetraploid wheat collection grown in Kazakhstan. A. Zatybekov, S. Anuarbek, S. Abugalieva, Y. Turuspekov
- 613 ORIGINAL ARTICLE
Genetic diversity of VIR *Raphanus sativus* L. collections on aluminum tolerance. A.B. Kurina, I.A. Kosareva, A.M. Artemyeva

- 625 REVIEW
Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding. M.A. Vishnyakova, A.V. Kushnareva, T.V. Shelenga, G.P. Egorova

Molecular and cell biology

- 636 ORIGINAL ARTICLE
Regions enriched for DNA repeats in chromosomes of *Macrostomum mirumnovem*, a species with a recent Whole Genome Duplication. K.S. Zadesenets, N.B. Rubtsov
- 643 ORIGINAL ARTICLE
Characteristic of the active substance of the *Saccharomyces cerevisiae* preparation having radioprotective properties. G.S. Ritter, V.P. Nikolin, N.A. Popova, A.S. Proskurina, P.E. Kisaretova, O.S. Taranov, T.D. Dubatolova, E.V. Dolgova, E.A. Potter, S.S. Kirikovich, Y.R. Efremov, S.I. Bayborodin, M.V. Romanenko, M.I. Meschaninova, A.G. Venyaminova, N.A. Kolchanov, S.S. Bogachev
- 653 ORIGINAL ARTICLE
Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells. A.A. Ostanin, O.Y. Leplina, E.A. Burakova, T.V. Tyrinova, A.A. Fokina, A.S. Proskurina, S.S. Bogachev, D.A. Stetsenko, E.R. Chernykh

Microbial genetics

- 661 REVIEW
Picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, detection methods. A.Yu. Kashnikov, N.V. Epifanova, N.A. Novikova
- 673 ORIGINAL ARTICLE
Wolbachia, *Spiroplasma*, and *Rickettsia* symbiotic bacteria in aphids (Aphidoidea). D.A. Romanov, I.A. Zakharov, E.V. Shaikevich

Влияние разных типов стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) на комбинационную способность ЦМС-линий сорго

О.П. Кибальник¹✉, Л.А. Эльконин²

¹ Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы, Саратов, Россия

² Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия

✉ e-mail: kibalnik79@yandex.ru

Аннотация. Изучение влияния цитоплазмы на комбинационную способность (КС) линий с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) представляет значительный интерес в плане понимания генетических функций цитоплазмы у растений и в практических целях для создания гибридов с улучшенными хозяйственно ценными признаками. С целью выяснения характера влияния разных типов стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) на КС у сорго исследовали проявление ряда агрономически ценных признаков у 54 гибридных комбинаций F₁, полученных с использованием в качестве материнских родителей изоядерных ЦМС-линий, созданных на основе линии Желтозерное 10 и различающихся только типами стерильных цитоплазм (А3, А4 и 9Е). В качестве отцовских родителей были 18 сортов и линий зернового сорго селекции ФГБНУ Российского НИИ сорго и кукурузы. Комбинационную способность определяли методом топкросса. Родительские компоненты и гибриды F₁ выращивали в 2015–2017 гг. в условиях недостаточной (2015–2016 гг.: гидротермический коэффициент (ГТК) = 0.32–0.66) либо хорошей (2017 г.: ГТК = 1.00) влагообеспеченности. В среднем за три года испытаний выявлены положительное влияние цитоплазмы 9Е на общую комбинационную способность (ОКС) по длине соцветия (0.63) и отрицательные эффекты цитоплазм А3 и А4 (–0.32 и –0.31) на ОКС по этому признаку. В засушливые сезоны отмечены значимые положительные эффекты цитоплазмы 9Е на ОКС по длине наибольшего листа, цитоплазмы А3 – на ОКС по высоте растений и отрицательное влияние цитоплазмы А4 на эти признаки. Во влажный сезон различия отсутствовали. Тип ЦМС не оказывал влияния на ОКС по ширине наибольшего листа и урожайности зерна. Дисперсия специфической комбинационной способности (СКС) в засушливые сезоны оказалась значимой для следующих признаков: длина листа, высота растений, длина и ширина метелки, урожайность. При этом линия с цитоплазмой 9Е отличалась наиболее высокими показателями дисперсии СКС, тогда как линия с цитоплазмой А4 – наименьшими. Полученные данные свидетельствуют, что разные типы стерильных цитоплазм сорго вносят различный вклад в КС в условиях засухи. Ключевые слова: *Sorghum bicolor* (L.) Moench; цитоплазматическая мужская стерильность; гетерозис; комбинационная способность; цитоплазматические эффекты; засуха.

Для цитирования: Кибальник О.П., Эльконин Л.А. Влияние разных типов стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) на комбинационную способность ЦМС-линий сорго. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6): 549-556. DOI 10.18699/VJ20.648

Influence of different types of sterile cytoplasm (A3, A4, 9E) on the combining ability of CMS lines of sorghum

O.P. Kibalnik¹✉, L.A. Elkonin²

¹ Russian Research and Project-technological Institute of Sorghum and Maize, Saratov, Russia

² Agricultural Research Institute of the South-East Region of Russia, Saratov, Russia

✉ e-mail: kibalnik79@yandex.ru

Abstract. Investigation of the effect of the cytoplasm on the combining ability (CA) of lines with cytoplasmic male sterility (CMS) is of considerable interest in terms of understanding the genetic functions of the cytoplasm and for practical purposes to create hybrids with improved economically valuable traits. In order to investigate the effect of different types of sterile cytoplasm (A3, A4, 9E) on CA in sorghum, we studied the manifestation of a number of biological and agronomic traits in 54 F₁ hybrid combinations obtained using iso-nuclear CMS lines with the nuclear genome of the line Zheltozernoye 10, differing only in the types of sterile cytoplasm (A3, A4 and 9E). Eighteen varieties and lines of grain sorghum developed at the Russian Research and Project-technological Institute of Sorghum and Maize were used as paternal parents. The CA was determined by the topcross method. F₁ hybrids and their parents were grown in 2015–2017 in conditions of insufficient (2015–2016: HTC (hydro-thermal coefficient) = 0.32–0.66), or good water availability conditions (2017: HTC = 1.00). On average, for three years of testing, a positive effect of the 9E cytoplasm on the general combining ability (GCA) (0.63) and negative effects of the A3 and A4 cytoplasm (–0.32 and –0.31) for the inflorescence length were noted. In dry seasons, significant positive effects of the 9E cytoplasm on GCA for the length of the largest leaf, and positive effects of the A3 cytoplasm on GCA for the plant height, and

negative effects of the A4 cytoplasm on GCA for these traits were observed. No differences were observed during the wet season. The type of CMS did not affect the GCA for the width of the largest leaf and grain yield. The dispersion of specific combining ability (SCA) in the dry seasons was significant for the following traits: leaf length, plant height, panicle length and width, and grain yield, the 9E cytoplasm had the highest SCA dispersion, whereas the A4 cytoplasm had the smallest one. The data obtained indicate that different types of sterile cytoplasm of sorghum make a different contribution to CA under conditions of drought stress.

Key words: *Sorghum bicolor* (L.) Moench; cytoplasmic male sterility; heterosis; combining ability; cytoplasmic effects; drought.

For citation: Kibalnik O.P., Elkonin L.A. Influence of different types of sterile cytoplasm (A3, A4, 9E) on the combining ability of CMS lines of sorghum. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):549-556. DOI 10.18699/VJ20.648

Введение

Цитоплазма как среда, в которой происходит функционирование ядерного генома, играет важную роль в генетическом контроле многих признаков растений. Наряду с широко известными и в ряде случаев хорошо изученными мутациями пестролистности и цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), возникающими в результате перестроек в хлоропластном и митохондриальном геномах, известно немало примеров эффекта цитоплазматического окружения на проявление многих признаков растений, в том числе имеющих важное биологическое и хозяйственное значение. В основе такого влияния цитоплазмы может лежать ретроградная регуляция экспрессии ядерных генов, осуществляемая посредством сигналов, продуцируемых цитоплазматическими органеллами под действием факторов внешней среды (Fujii, Toriyama, 2008), при этом генетически различные пласты и митохондрии могут по-разному реагировать на условия внешней среды и влиять на экспрессию ядерных генов. Кроме того, цитоплазма способна вызывать наследуемые изменения в ядерном геноме по типу парамутаций (Zavalishina, Турнов, 2003, 2010), а также изменять характер метилирования нуклеотидных последовательностей ядерных генов (Xu et al., 2013; Va et al., 2014), а также мобильных генетических элементов (Elkonin et al., 2018), что может отражаться на уровне экспрессии соответствующих генов и иметь значительные генетические последствия, так как изменение характера метилирования транспозонов – один из ключевых факторов их мобильности и, как следствие, возникновения мутаций (Yaakov, Kashkush, 2011).

Большинство агрономически ценных признаков растений – полигенные, они формируются в результате взаимодействия продуктов многих ядерных генов между собой и с факторами внешней среды. В связи с этим цитоплазматическое окружение может оказывать значительное влияние на проявление этих признаков. В литературе имеется немало данных, подтверждающих эффект цитоплазмы на селекционно-ценные признаки у линий и гибридов пшеницы (Atienza et al., 2007), риса (Tao et al., 2011), хлопчатника (Tuteja, Banga, 2011), африканского проса (Amiribehzadi et al., 2012), озимой ржи (Урбан, Гордей, 2013), сорго (Aruna et al., 2013), подсолнечника (Jan et al., 2014), кукурузы (Кабанова и др., 2015), горчицы (Chakrabarty et al., 2015). Ввиду того, что проявление гетерозиса у гибридов F_1 в значительной степени определяется комбинационной способностью (КС) материнских линий, исследование влияния цитоплазмы на КС представляет интерес. Однако работ, посвященных эффекту цитоплазмы на КС, мало.

Так, у африканского проса отмечены преимущественный эффект цитоплазм А4 и А5, в сравнении с цитоплазмой А1, на урожайность зерна и влияние на структурные компоненты урожайности (Chandra-Shekara et al., 2007; Pujjar et al., 2019). Испытания новых источников ЦМС (ХА, Е002-91А, РКУ-2А, АРГ-2А, АРГ-3А, АРГ-6А, DV-10А, РНІР-27А, РRUN-29А) подсолнечника в программах скрещиваний показали положительный эффект стерильных цитоплазм Е002-91А (*Helianthus annuus*), АРГ-3А (*H. argophyllus*) и АРГ-6А (*H. argophyllus*) на КС материнских линий по продуктивности семян в сравнении с нормальной цитоплазмой NC-41В (Tyagi, Dhillon, 2016). Аналогичное влияние цитоплазм А4 и А8 на общую комбинационную способность (ОКС) линий установлено у риса (Young, Virmani, 1990).

В исследованиях на сорго получены противоречивые результаты, демонстрирующие как эффект цитоплазмы А2 на ОКС ЦМС-линий по продолжительности межфазного периода «всходы–цветение», урожайности зерна, массе зерна с одной метелки и 100 зерен в сравнении с А1 (Kishan, Borikar, 1989; Ramesh et al., 2006; Reddy et al., 2007, 2009), так и отсутствие цитоплазматических эффектов (Williams-Alanís, Rodríguez-Herrera, 1994).

Цель настоящей работы – изучение влияния разных стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) на комбинационную способность у сорго с использованием изоядерных ЦМС-линий, различающихся только типами стерильности.

Материалы и методы

Для выявления цитоплазматических эффектов на КС использовали созданные нами раннеспелые аллоплазматические изоядерные ЦМС-линии сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) с ядерным геномом фертильной линии Желтозерное 10 (Ж10) на основе генетически различных типов стерильных цитоплазм – А3, А4 и 9Е (Эльконин и др., 1997). Эти линии получены путем серий беккроссов Желтозерного 10 с ЦМС-линиями А3 Тх398, А4 Тх398, 9Е Тх398 (предоставлены К.Ф. Schertz, Texas Agricultural Experimental Station, США), несущими цитоплазмы следующих источников стерильности: А3 (IS112С), А4 (IS7920С), 9Е (IS17218). В исследовании использовали материнские растения из семей ВС₁₈. В качестве опылителей были 18 сортов и линий зернового сорго: раннеспелые – Перспективный 1, Меркурий, Огонек, Аванс, Факел, Азарт, Гарант, Топаз, Волжское 615 и среднеранние – Старт, Л-КСИ 28/13, Камелик, Гелеофор, Кремовое, Пищевое 614, Сармат, Восторг, Пищевое 35, – различающихся между собой по основным хозяйственно ценным признакам и харак-

теризующихся высокой адаптационной способностью к агроклиматическим условиям региона (Кибальник и др., 2010; Kibalnik et al., 2017). Гибриды F_1 , полученные с использованием этих опылителей, относились к группе среднеспелых (110–117 дней до полной спелости).

Отцовские формы выращивали в условиях строгой изоляции (с изолированием метелки пергаментными изоляторами до начала цветения) в течение 8–25 поколений. Все опылители были закрепителями стерильности исследуемых типов ЦМС, за исключением Перспективного 1 и Л-КСИ 28/13, являющихся восстановителями фертильности ЦМС А4 и 9Е и обеспечивающих 80–100 % завязываемость зерна в условиях строгой изоляции (Кибальник, Семина, 2018).

Анализировали следующие признаки: высота растений; длина и ширина наибольшего листа, длина и ширина соцветия; масса и число зерен с одной метелки; урожайность зерна. Поскольку отцовские родители не были универсальными восстановителями фертильности и большая часть исследуемых гибридов характеризовалась мужской стерильностью, то для учета признаков, связанных с зерновой продуктивностью, использовали соцветия, зерно на которых завязалось от свободного опыления. Выращивание в режиме свободного опыления среди сотен тысяч фертильных растений ежегодно обеспечивало 100 % завязываемость всех метелок исследуемых гибридов. Такой подход уже применяли при исследовании урожайности гибридов на цитоплазме А3 (Morgan, Rooney, 2003).

Гибриды F_1 (всего 54) высевали на опытном поле ФГБНУ «Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы» в 2015–2017 гг. в третьей декаде мая. Почва опытного участка представлена черноземом южным среднесуглинистым. Содержание гумуса в пахотном слое составляло 3.5 %. Нитрификационная способность (по Кравкову) – 7.7 мг/кг; фосфор (по Мачигину) – 34.2–35.7 мг/кг, калий (в углеаммонийной вытяжке) – 349–378 мг/кг. В каждый сезон применяли зональную технологию возделывания сорго, не включающую искусственное орошение (Горбунов и др., 2012). Предшественник – пар. Повторность в опыте трехкратная. Размещение делянок площадью 7.7 м² – рандомизированное. Густоту стояния растений устанавливали вручную – 100 тыс. раст./га. Оценка признаков и учет урожайности проводили по методике государственного испытания сельскохозяйственных культур (Методика..., 1989). Комбинационную способность родительских форм определяли по методу топкросса (Савченко, 1973). Результаты исследований обработаны с помощью статистического анализа выборки и дисперсионного однофакторного анализа посредством программы «Агрос 2.09» (Мартынов, 1999).

Метеоусловия за сезоны исследования варьировали. Высокой влагообеспеченностью характеризовался 2017 г.: гидротермический коэффициент (ГТК) равен 1.00 (сумма активных температур – 1072.3 °С и количество осадков – 107.1 мм). Во время периода «всходы–цветение» сорго в 2015 (ГТК = 0.66) и 2016 гг. (ГТК = 0.32) отмечены засушливые условия. Сумма активных температур составляла 1144.9–1167.9 °С, количество осадков – 75.2 и 37.3 мм соответственно.

Результаты

Анализ варьирования агрономически ценных признаков у гибридов F_1 . Для изучения влияния цитоплазмы на комбинационную способность изоядерных ЦМС-линий предварительно проведена оценка варьирования изучаемых признаков у 54 гибридов F_1 (табл. 1).

Обнаружено слабое варьирование признаков «высота растения» ($V = 7.4–11.7$ %), «длина соцветия» ($V = 7.7–11.0$ %), «длина наибольшего листа» ($V = 7.3–11.2$ %) (см. табл. 1). Средняя изменчивость установлена по ширине наибольшего листа ($V = 10.5–15.1$ %), по остальным признакам показана высокая вариабельность. Более высокие коэффициенты вариации изучаемых признаков были отмечены в 2015 г., за исключением длины наибольшего листа.

Дисперсионным анализом подтверждены различия между испытываемыми гибридами F_1 по агрономически ценным признакам: $F_{\text{факт.}} > F_{\text{теор.}}$. По массе зерен с одной метелки в среднем за три года испытаний значимых различий между гибридами на 5 % уровне не выявлено, поэтому комбинационная способность не определена.

Комбинационная способность изоядерных ЦМС-линий
Вегетативные признаки. Цитоплазмы А3 и 9Е достоверно увеличивали показатели эффектов ОКС ЦМС-линий по высоте растений в 2015 г. (2.08–2.71); дисперсий СКС в 2015 г. (253.47–305.75) и 2016 г. (75.16–109.25) в сравнении с цитоплазмой А4 (рис. 1).

Различия эффектов ОКС ЦМС-линий по параметрам наибольшего листа наблюдали только в 2016 г. Эффекты ОКС ЦМС-линии с цитоплазмой 9Е (1.78) существенно выше, чем линии с цитоплазмой А4 (–2.22). На комбинационную способность ЦМС-линий по ширине наибольшего листа цитоплазматический эффект не выявлен. Вместе с тем отмечена тенденция к проявлению более высоких показателей эффектов ОКС у линии 9Е Желтозерное 10 (ежегодно). Анализ СКС показал влияние типа ЦМС на параметры наибольшего листа в 2015–2016 гг. исследований. На ширину листа цитоплазма А3 оказала наибольший эффект: дисперсии СКС составили 0.27–0.36. Цитоплазма А4 снижала значения дисперсий СКС по параметрам наибольшего листа (табл. 2).

Признаки генеративных органов. Установлено значимое влияние цитоплазмы 9Е на эффекты ОКС по длине соцветия в 2015–2016 гг. и в среднем за три года (рис. 2). Более высокие показатели ОКС по ширине соцветий также обнаружены в 2015 г. на цитоплазме 9Е: 0.32 против –0.29 и –0.03 на цитоплазмах А3 и А4 соответственно. Дисперсия СКС по параметрам метелки оказалась значимо выше у ЦМС-линии 9Е Желтозерное 10: по длине соцветия – в каждый сезон вегетации, а по ширине соцветия – только в 2015–2016 гг. (см. рис. 2).

Установлен стимулирующий цитоплазматический эффект на ОКС ЦМС-линий по массе и числу зерен с одной метелки в 2016 г. и СКС – в 2015–2016 гг., т. е. при «засушливых» условиях выращивания гибридов F_1 . При этом эффекты ОКС по массе и числу зерен с одной метелки существенно выше у А3 Желтозерное 10 (1.24 и 43.19 соответственно), а дисперсии СКС ниже у А4 Желтозерное 10 (в разные сезоны: 3.59–18.40 и 9154.16–12129.40 соответственно) (табл. 3).

Таблица 1. Изменчивость агрономически ценных признаков гибридов F₁, полученных на основе изоядерных ЦМС-линий сорго Желтозерное 10 с генетически различными типами стерильных цитоплазм А3, А4 и 9Е

Признак, статистический показатель	Значение признака (min...max) ¹			
	2015 г.	2016 г.	2017 г.	Среднее ²
Высота при созревании, см	148.8–258.9	139.5–243.4	159.3–215.3	154.8–219.2
Коэффициент вариации, %	11.7	9.1	7.4	7.4
F _{факт.}	8.93*	5.80*	3.54*	2.41*
Длина соцветия, см	15.6–26.5	13.8–27.2	16.5–32.8	17.6–25.4
Коэффициент вариации, %	11.0	8.9	9.8	7.7
F _{факт.}	5.89*	4.92*	2.74*	1.99*
Ширина соцветия, см	4.6–15.0	3.8–11.0	7.8–17.8	5.9–13.1
Коэффициент вариации, %	25.7	19.7	21.1	19.3
F _{факт.}	9.71*	5.35*	2.21*	3.20*
Длина наибольшего листа, см	54.8–86.1	48.2–74.1	55.8–77.6	54.3–77.1
Коэффициент вариации, %	8.8	11.2	8.6	7.3
F _{факт.}	5.46*	4.45*	3.39*	2.85*
Ширина наибольшего листа, см	4.1–8.2	3.6–7.0	4.7–7.5	4.7–6.8
Коэффициент вариации, %	15.1	13.6	10.5	9.4
F _{факт.}	6.25*	2.76*	2.08*	2.06*
Масса зерна с 1 метелки, г	5.9–45.5	5.6–27.4	27.7–70.6	17.0–39.5
Коэффициент вариации, %	45.4	38.8	22.1	20.1
F _{факт.}	10.16*	10.88*	2.27*	1.31
Число зерен с 1 метелки, шт.	174–1308	234–1159	804–2336	503–1430
Коэффициент вариации, %	44.4	35.6	19.8	18.9
F _{факт.}	8.45*	6.67*	1.94*	1.65*
Урожайность зерна, т/га	1.09–7.53	0.93–4.33	3.41–8.49	2.34–5.59
Коэффициент вариации, %	48.6	31.4	19.9	22.4
F _{факт.}	12.42*	5.08*	1.48*	2.14*

¹ min и max – минимальное и максимальное значения признака; ² среднее – показатель признака в среднем за 2015–2017 гг.; * p > 0.95.

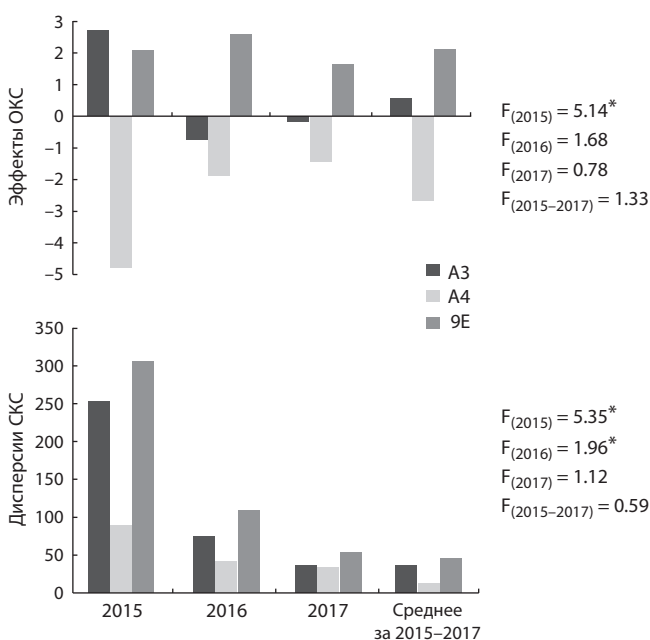


Рис. 1. Влияние типа стерильной цитоплазмы на комбинационную способность изоядерных ЦМС-линий по высоте растений.

* p > 0.95.

Эффекты ОКС материнских линий по урожайности зерна существенно не различались (рис. 3). В среднем по трехлетним данным, чуть выше показатели у цитоплазмы А3 – 0.06, тогда как на цитоплазмах А4 и 9Е – 0.10 и 0.03 соответственно.

Цитоплазматические эффекты на СКС по урожайности зерна отмечены только в 2015 г.: цитоплазма А3 достоверно увеличивала показатели дисперсии СКС в сравнении с 9Е: 0.36 против 0.19.

Обсуждение

Анализ комбинационной способности ЦМС-линий – важнейший этап в селекции гетерозисных гибридов. Один из эффективных способов определения КС – метод топ-кросса, при применении которого все исследуемые линии скрещивают с несколькими тестерами (Кильчевский и др., 2008). При этом ОКС родительской формы измеряется средним значением отклонения признака у всех гибридов с данной линией от общего среднего по всем гибридам (Хотылева и др., 2016). Этот метод позволяет сравнивать между собой разные линии, и чем большее число тестеров вовлечено в гибридизацию, тем точнее будут результаты такого сравнения. В нашем исследовании в скрещивания были вовлечены изоядерные ЦМС-линии, отличающиеся

Таблица 2. Комбинационная способность изоядерных ЦМС-линий сорго Желтозерное 10 с генетически различными типами стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) по параметрам наибольшего листа

Тип ЦМС	Длина				Ширина			
	2015 г.	2016 г.	2017 г.	Среднее	2015 г.	2016 г.	2017 г.	Среднее
Эффекты ОКС								
А3	0.96	0.44	-0.90	0.16	-0.07	-0.12	-0.20	-0.12
А4	-1.03	-2.22	-0.11	-1.12	-0.01	0.04	0.07	0.03
9Е	0.07	1.78	1.01	0.95	0.07	0.08	0.14	0.09
F _{факт.}	2.38	6.92*	1.62	2.34	0.65	1.11	2.85	1.52
Дисперсия СКС								
А3	15.94	23.81	10.02	6.31	0.36	0.27	0.22	0.07
А4	13.51	10.41	5.20	2.48	0.23	0.14	0.13	0.03
9Е	20.34	18.22	6.19	6.87	0.22	0.17	0.11	0.04
F _{факт.}	3.31*	2.44*	1.04	0.93	2.99*	1.69*	1.13	0.48

* $p > 0.95$.

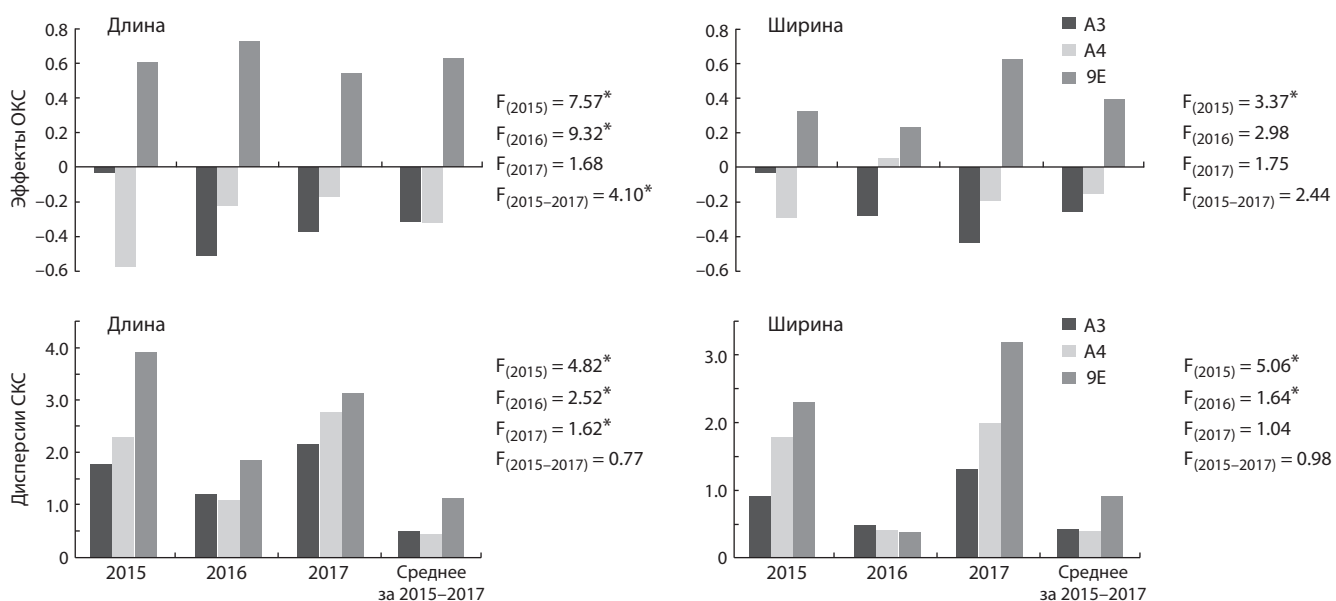


Рис. 2. Влияние типа цитоплазмы (А3, А4, 9Е) на ОКС и СКС изоядерных ЦМС-линий сорго Желтозерное 10 по параметрам соцветия.

* $p > 0.95$.

Таблица 3. Комбинационная способность изоядерных ЦМС-линий сорго Желтозерное 10 с генетически различными типами стерильных цитоплазм (А3, А4, 9Е) по массе и числу зерен с одного соцветия

Тип ЦМС	Масса зерен			Число зерен			
	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2015 г.	2016 г.	2017 г.	Среднее
Эффекты ОКС							
А3	-0.64	1.24	0.22	-11.96	43.19	10.87	14.63
А4	1.19	-0.02	-2.66	27.04	-6.33	-76.41	-17.95
9Е	-0.55	-1.22	2.44	-15.07	-36.85	65.55	3.32
F _{факт.}	2.33	8.17*	2.94	1.33	4.37*	2.10	0.27
Дисперсия СКС							
А3	26.06	8.68	17.88	18994.14	13808.67	15072.85	5839.94
А4	18.40	3.59	32.82	12129.40	9154.16	23906.35	6353.38
9Е	22.99	8.47	31.82	17221.55	15883.96	23156.41	7521.93
F _{факт.}	4.09*	3.11*	1.03	3.24*	2.89*	0.71	0.53

* $p > 0.95$.

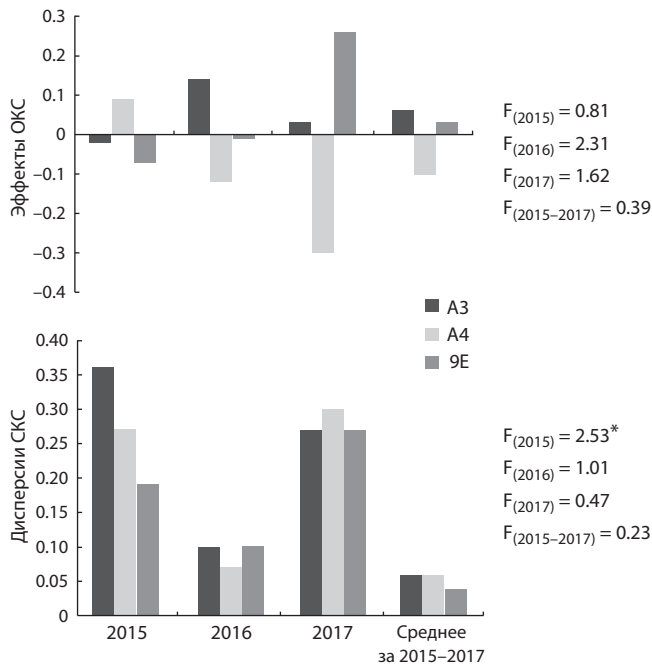


Рис. 3. Влияние типа цитоплазмы (A3, A4, 9E) на комбинационную способность изоядерных ЦМС-линий сорго Желтозерное 10 по урожайности зерна.

* $p > 0.95$.

друг от друга только типом цитоплазмы. С каждой из этих линий получены гибриды F_1 , при этом в качестве отцовских родителей были взяты одни и те же линии. Поэтому сравнение между собой наборов гибридов F_1 позволяет выявить наличие или отсутствие влияния цитоплазмы на комбинационную способность изучаемых ЦМС-линий.

Представленные выше экспериментальные данные наглядно демонстрируют эффект цитоплазмы на КС изоядерных линий сорго. Так, в среднем за три года испытаний показаны положительное влияние цитоплазмы 9E на ОКС по длине соцветия (0.63) и отрицательные эффекты цитоплазм A3 и A4 (-0.32 и -0.31) на ОКС по этому признаку. Следует отметить, что для учета признаков, определяющих зерновую продуктивность гибридов, мы использовали метелки, завязавшие зерно в режиме свободного опыления. Такой подход уже применялся ранее при изучении гибридов с ЦМС A3 (Moran, Rooney, 2003) и был обусловлен редкой встречаемостью восстановителей фертильности этого типа (Worstell et al., 1984; Torres-Cardona et al., 1990; Dahlberg, Madera-Torres, 1997). Среди использованных нами отцовских родителей восстановители ЦМС A3 также отсутствовали; восстановители ЦМС A4 и 9E были немногочисленны и не способны к восстановлению фертильности ЦМС A3. В связи с этим гибридные комбинации в наших опытах ежегодно выращивали на опытном поле в режиме свободного опыления среди сотен тысяч фертильных растений, что обеспечивало полноценное опыление всех метелок исследуемых гибридов.

Примечательно, что проявление цитоплазматических эффектов зависит от гидротермического режима выращивания растений. Так, значимые положительные эффекты цитоплазм на ОКС установлены в засушливые сезоны:

для 9E – по длине наибольшего листа, для A3 – по высоте растений, тогда как во влажный сезон различия между ними отсутствовали. Именно в условиях засухи было негативное влияние цитоплазмы A4 на КС по многим признакам: длине и ширине листа, числу зерен с метелки, урожайности. По-видимому, цитоплазма A4 менее устойчива к экстремальным климатическим условиям, характеризующимся недостаточными гидротермическими показателями для развития сорго (отсутствие необходимого количества осадков, сопровождающееся высокими среднесуточными температурами воздуха). Как следствие, комбинационная способность ЦМС-линии A4 Желтозерное 10 по комплексу изученных признаков оказалась более низкой. Кроме того, эффекты ОКС менее зависимы от условий внешней среды, чем СКС. Возможно, именно по этой причине в экспериментах наблюдались различия в значимости влияния цитоплазмы на ОКС и СКС в конкретный сезон выращивания гибридов сорго. Так, ЦМС-линии различаются по дисперсиям СКС длины наибольшего листа (2015 г.), ширины наибольшего листа (2015–2016 гг.), высоте растений (2016 г.), урожайности зерна (2015 г.), массе и числу зерен с одной метелки (2015 г.), тогда как по эффектам ОКС различия были незначимы. Аналогичная зависимость проявления цитоплазматических эффектов от условий внешней среды обнаружена у африканского проса, при этом цитоплазмы A4 и A5 имели большую экологическую устойчивость, по сравнению с цитоплазмами A1, A2 и A3 (Chandra-Shekara et al., 2007).

Согласно литературным данным, влияние типа ЦМС на длину метелки отмечено у гибридов кукурузы (Кабанова и др., 2015); цитоплазматические эффекты на параметры листьев выявлены у гибридов кукурузы на основе С- и S-типов ЦМС: по длине листа выделились гибриды на основе С-типа, по ширине листа – аналоги S-типа (Франковская и др., 1995).

У сорго эффект типа цитоплазмы на ОКС по урожайности зерна и массы 100 зерен был ранее показан в работах индийских исследователей, при этом цитоплазма A2 имела преимущество по сравнению с цитоплазмами A1 и A4 (Kishan, Borikar, 1989; Ramesh et al., 2006; Reddy et al., 2007, 2009). В наших исследованиях обнаружено, что цитоплазма 9E увеличивала ширину листа у сорго-суданковых гибридов (Кибальник, Эльконин, 2012), а у гибридов зернового сорго – фотосинтетический потенциал в период «выметывание–полная спелость» (Бычкова, Эльконин, 2016), в сравнении с цитоплазмой A3. Отмечено также влияние стерильной цитоплазмы на КС ЦМС-линий сорго по интенсивности начального роста растений, при этом цитоплазма 9E способствовала увеличению, а цитоплазма A4 – снижению эффектов ОКС (Elkonin et al., 2018). Установлен положительный эффект цитоплазмы 9E на КС по продуктивности биомассы в более засушливые сезоны в сравнении с цитоплазмами A3 и A4 (Elkonin et al., 2018), тогда как цитоплазма A3 оказывала стимулирующий эффект на урожайности зерна в сухой и жаркий вегетационный сезон (Бычкова, Эльконин, 2017). Совокупность этих данных свидетельствует, что цитоплазма играет существенную роль в проявлении многих агрономически ценных признаков у сорго, снижая или повышая устойчивость растений к стрессу засухи.

Заключение

Установлено влияние цитоплазмы на комбинационную способность линий зернового сорго по агрономически ценным признакам: высоте растений, длине и ширине наибольшего листа и соцветия, массе зерна и числу зерен с одной метелки, урожайности зерна. Проявление цитоплазматических эффектов у гибридов сорго зависит от специфического взаимодействия генотипов родительских линий и гидротермических факторов сезона возделывания. Значимые различия по комбинационной способности изоядерных линий Желтозерное 10 с цитоплазмами А3, А4 и 9Е отмечены в засушливые сезоны вегетации (2015–2016 гг.). По высоте растений значимой ОКС отличалась А3 Ж10, тогда как СКС – 9Е Ж10. По длине и ширине листа наибольшие показатели дисперсии СКС характерны для линии А3 Ж10. По длине и ширине соцветия высокие эффекты ОКС и дисперсии СКС отмечены у линии 9Е Ж10. По массе зерна и числу зерен с одной метелки наибольшей ОКС характеризуется линия А3 Ж10, а СКС – А3 и 9Е. Значительной дисперсией СКС по урожайности зерна отличалась линия 9Е Желтозерного 10. По основным изученным агрономическим показателям цитоплазма А4 снижала значения комбинационной способности.

Полученные экспериментальные данные об эффектах цитоплазм А3 и 9Е целесообразно использовать в селекционных программах по созданию засухоустойчивых гибридов зернового сорго с улучшенными агрономически ценными признаками.

Список литературы / References

- Бычкова В.В., Эльконин Л.А. Влияние типа стерильной цитоплазмы на фотосинтетические параметры гибридов зернового сорго. *Зерновое хозяйство России*. 2016;4(46):5-8.
[Bychkova V.V., Elkonin L.A. The effect of the type of sterile cytoplasm on the photosynthetic parameters of the grain sorghum hybrids. *Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia*. 2016;4(46):5-8. (in Russian)]
- Бычкова В.В., Эльконин Л.А. Влияние типа стерильной цитоплазмы на урожайность зерна, биомассу и содержание белка у гибридов зернового сорго. *Таврический вестник аграрной науки*. 2017;1(9):37-44.
[Bychkova V.V., Elkonin L.A. Effect of the sterile cytoplasm type on grain yield, biomass, and protein content in grain sorghum hybrids. *Tavrisheskiy Vestnik Agrarnoy Nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2017;1(9):37-44. (in Russian)]
- Горбунов В.С., Костина Г.И., Ишин А.Г., Колов О.В., Жужукин В.И., Семин Д.С., Ефремова И.Г., Лящева С.В., Кибальник О.П., Ревякин Е.Л. Ресурсосберегающая технология производства зернового сорго. М.: Росинформагротех, 2012.
[Gorbunov V.S., Kostina G.I., Ishin A.G., Kolov O.V., Zhuzhukin V.I., Semin D.S., Efremova I.G., Lyascheva S.V., Kibalnik O.P., Revyakin E.L. Resource-Saving Technology of Grain Sorghum Production. Moscow, 2012. (in Russian)]
- Кабанова Е.М., Казакова В.В., Сивовол А.А. Влияние цитоплазматической мужской стерильности на длину метелки и высоту прикрепления початков кукурузы. *Труды КубГАУ*. 2015;57:84-88.
[Kabanova E.M., Kazakova V.V., Sivovol A.A. The influence of cytoplasmic male sterility on panicle length and the height of ear attachment in maize. *Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Proceeding of the Kuban State Agrarian University*. 2015;57:84-88. (in Russian)]
- Кибальник О.П., Костина Г.И., Семин Д.С. Оценка пластичности и стабильности зернового сорго в условиях Саратовской области. *Аграр. вестн. Юго-Востока*. 2010;3-4:64-67.
[Kibalnik O.P., Kostina G.I., Semin D.S. Plasticity and stability assessment the grain sorghum under the conditions of Saratov region. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka = Agrarian Reporter of South-East*. 2010;3-4:64-67. (in Russian)]
- Кибальник О.П., Семин Д.С. Использование А3, А4 и 9Е типов ЦМС в селекции гибридов зернового сорго. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2018;5:22-25. DOI 10.31857/S250026270000640-9.
[Kibalnik O.P., Semin D.S. Using A3, A4, and 9E CSM types in breeding grain sorghum hybrids. *Russian Agricultural Sciences*. 2018;44:516-520. DOI 10.3103/S1068367418060071.]
- Кибальник О.П., Эльконин Л.А. Влияние типа стерильной цитоплазмы на проявление хозяйственно-полезных признаков у сорго-суданковых гибридов. *Докл. РАСХН*. 2012;1:12-15.
[Kibalnik O.P., Elkonin L.A. Effect of sterile cytoplasm type on economically-valuable traits of the sorghum-sudangrass hybrids. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2012;1:12-15. (in Russian)]
- Кильчевский А.В., Хотылева Л.В., Тарутин Л.А., Шаптуренко М.Н. Гетерозис в селекции сельскохозяйственных растений. В: Молекулярная и прикладная генетика. Т. 8. Минск: Право и экономика, 2008;7-25.
[Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V., Tarutina L.A., Shapturenko M.N. Heterosis in breeding of agricultural plants. In: *Molecular and Applied Genetics*. V. 8. Minsk, Pravo i Ekonomika Publ., 2008;7-25. (in Russian)]
- Мартынов С.П. Статистический и биометрико-генетический анализ в растениеводстве и селекции. Пакет программ «AGROS 2.09». Тверь, 1999.
[Martynov S.P. Statistical and Biometrical Genetic Analysis in Crop Production and Breeding: A Software package. Tver, 1999. (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 2. М., 1989.
[Methods of state variety testing of agricultural crops. V. 2. Moscow, 1989. (in Russian)]
- Савченко В.К. Метод оценки комбинационной способности генетически разнокачественных наборов родительских форм. В: Методики генетико-селекционного и генетического экспериментов. Минск, 1973.
[Savchenko V.K. A method for assessing the combinational ability of genetically heterogeneous sets of parental forms. In: *Methods of Breeding and Genetic Experiments*. Minsk, 1973. (in Russian)]
- Урбан Э.П., Гордей С.И. Использование ЦМС Р- и G-типов в селекции и семеноводстве гетерозисных гибридов F1 озимой ржи (*Secale cereale* L.). *Земледелие и селекция в Беларуси*. 2013;49:291-299.
[Urban E.P., Hardzei S.I. Use of CMS of P- and G-types in breeding and seed growing of heterotic winter rye (*Secale cereale* L.) F1 hybrids. *Zemledelie i Seleksiya v Belarusi = Agriculture and Breeding in Belarus*. 2013;49:291-299. (in Russian)]
- Франковская М.Т., Папазов Д.Ю., Огняник Л.Г. Влияние разных типов ЦМС на продуктивность гибридов. *Кукуруза и сорго*. 1995;3:4-5.
[Frankovskaya M.T., Papazov D.Yu., Ognyanik L.G. The influence of different types of CMS on the performance of hybrids. *Kukuruz a i Sorgo = Maize and Sorgum*. 1995;3:4-5. (in Russian)]
- Хотылева Л.В., Кильчевский А.В., Шаптуренко М.Н. Теоретические аспекты гетерозиса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(4):482-492. DOI 10.18699/VJ16.174.
[Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V., Shapturenko M.N. Theoretical aspects of heterosis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):482-492. DOI 10.18699/VJ16.174. (in Russian)]
- Эльконин Л.А., Кожемякин В.В., Ишин А.Г. Использование новых типов ЦМС-индуцирующих цитоплазм для создания скоро-

- спелых линий сорго с мужской стерильностью. Докл. РАСХН. 1997;2:7-9.
- [Elkonin L.A., Kozshemyakin V.V., Ishin A.G. Using new types of CMS-inducing cytoplasm to create precocious sorghum lines with male sterility. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 1997;2:7-9. (in Russian)]
- Amiribehzadi A., Satyavathi C.T., Singh S.P., Bharadwaj C., Singh M.P. Estimation of heterosis in diverse cytoplasmic male sterile sources of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) Br. R). *Ann. Agric. Res. New Series*. 2012;33(4):220-227.
- Aruna C., Shrotria P.K., Pahuja S.K., Umakanth A.V., Bhat B.V., Devender A.V., Patil J.V. Fodder yield and quality in forage sorghum: scope for improvement through diverse male sterile cytoplasm. *Crop Pasture Sci*. 2013;63(12):1114-1123. DOI 10.1071/CP12215.
- Atienza S.G., Martin A.C., Ramirez M.C., Martin A., Ballesteros J. Effect of *Hordeum chilense* cytoplasm on agronomic traits in common wheat. *Plant Breed*. 2007;126:5-8. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01319.x.
- Ba Q., Zhang G., Niu N., Ma S., Wang J. Cytoplasmic effects on DNA methylation between male sterile lines and the maintainer in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*. 2014;549:192-197.
- Chakrabarty S.K., Maity A., Yadav J.V. Influence of cyto-sterility source of female line on seed quality of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern & Coss.) in relation to storage period. *Plant Breed*. 2015;134(3):333-337. DOI 10.1111 / pbr.12267.
- Chandra-Shekara A.C., Prasanna B.M., Singh B.B., Unnikrishan K.V., Seetharam A. Effect of cytoplasm and cytoplasm-nuclear interaction on combining ability and heterosis for agronomic traits in pearl millet {*Pennisetum glaucum* (L.) Br. R}. *Euphytica*. 2007;153:15-26. DOI 10.1007/s10681-006-9194-4.
- Dahlberg J.A., Madera-Torres P. Restorer reaction in A1 (AT 623), A2 (A2T 632), and A3 (A3SC 103) cytoplasm to selected accessions from the Sudan sorghum collection. *Int. Sorghum Millet Newsl*. 1977;38:43-58.
- Elkonin L., Kibalnik O., Zavalishina A., Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic function of cytoplasm in plants with special emphasis on sorghum. In: Dejesus C., Trask L. (Eds.). *Chloroplasts and Cytoplasm. Structure and Function*. New York: Nova Science Publ., 2018.
- Fujii S., Toriyama K. Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol*. 2008;49:1484-1494.
- Jan C., Seiler G., Hammond J.J. Effect of wild *Helianthus* cytoplasm on agronomic and oil characteristics of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed*. 2014;133(2):262-267. DOI 10.1111/pbr.12151.
- Kibalnik O., Semin D., Gorbunov V., Zhuzhukin V., Efremova I., Kukoлева S., Starchak V., Arhipov A., Kameneva O. Directions of breeding of grain sorghum in the Low Volga region of Russia. In: *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*. 2017;1:226-229. DOI 10.15414/agrobiodiversity.2017.2585-8246. 226-229.
- Kishan A.G., Borikar S.T. Line × tester analysis involving diverse cytoplasm system in sorghum. *Plant Breed*. 1989;102(2):153-157. DOI 10.1111/j.1439-0523.1989.tb00329.x.
- Moran J.L., Rooney W.L. Effect of cytoplasm on the agronomic performance of grain sorghum hybrids. *Crop Sci*. 2003;43(3):777-781. DOI 10.2135/cropsci2003.0777.
- Pujjar M., Govindaraj M., Gangaprasad S., Kanatti A. Effect of isonuclear-alloplasmic cytoplasmic male sterility on grain yield in pearl millet. *Indian J. Genet.* 2019;79(Suppl. 1):141-149. DOI 10.31742/IJGPB.79S.1.3.
- Ramesh S., Reddy B.V.S., Reddy S., Ramaiah B. Influence of cytoplasmic-nuclear male sterility on agronomic performance of sorghum hybrids. *Int. Sorghum Millet Newsl*. 2006;47:21-25.
- Reddy B.V.S., Ramesh S., Reddy P.S., Kumar A.A. Male-sterility inducing cytoplasmic effect on combining ability in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Indian J. Genet. Plant Breed*. 2009; 69(3):199-204.
- Reddy B.V.S., Ramesh S., Reddy P.S., Ramaiah B. Combining ability and heterosis as influenced by male-sterility inducing cytoplasm in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Euphytica*. 2007;154: 153-164. DOI 10.1007/s10681-006-9281-6.
- Tao D., Xu P., Zhou J., Deng X., Li J., Deng W., Yang J., Yang G., Li Q., Hu F. Cytoplasm affects grain weight and filled-grain ratio in indica rice. *BMC Genet*. 2011;12:53. DOI 10.1186/1471-2156-12-53.
- 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. *Texas Agric. Exp. Stn*. 1990;MP-1721:1-11.
- Tuteja O.P., Banga M. Effect of cytoplasm on heterosis for agronomic traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *Indian J. Agric. Sci*. 2011;81(11):1001-1007.
- Tyagi V., Dhillon S.K. Cytoplasmic effect on combining ability for agronomic traits in sunflower under different irrigation regimes. *SABRAO J. Breed Genet*. 2016;48(3):295-308.
- Williams-Alanis H., Rodríguez-Herrera R. Combining ability on isogenic sorghum in A1 and A2 cytoplasm. *Int. Sorghum Millets Newsl*. 1994;35:75.
- Worstell J.V., Kidd H.J., Schertz K.F. Relationships among male-sterility inducing cytoplasm of sorghum. *Crop Sci*. 1984;24(1):186-189.
- Xu P., Yan W., He J., Li Y., Zhang H., Peng H., Wu X. DNA methylation affected by male sterile cytoplasm in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed*. 2013;31:719-727.
- Yaakov B., Kashkush K. Methylation, transcription, and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. *Int. J. Plant Genom*. 2011;2011:569826:7. DOI 10.1155/2011/569826.
- Young J.B., Virmani S.S. Effects of cytoplasm on heterosis and combining ability for agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 1990;48:177-188.
- Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. The starting mechanism for paramutation: cytoplasm as a factor. *Maize Gen. Coop. Newsl*. 2003;77: 66-67.
- Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Cytoplasm-induced paramutations in maize. In: 52nd Annual Maize Genetics Conference. Riva del Garda (Trento), March 18–21, 2010. Riva del Garda (Trento). 2010;165.

ORCID ID

O.P. Kibalnik orcid.org/0000-0002-1808-8974
L.A. Elkonin orcid.org/0000-0003-3806-5697

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства сельского хозяйства РФ и тематического плана ФГБНУ РосНИИСК «Россорго», ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.02.2020. После доработки 30.06.2020. Принята к публикации 30.06.2020.

Молекулярные маркеры в генетическом анализе скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью

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

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

✉ e-mail: i.v.porotnikov@gmail.com

Аннотация. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.), сорта которой широко используются в мировом производстве зерна, плохо скрещивается с видами других родов Triticeae Dum., что ограничивает возможности введения чужеродного генетического материала в ее генофонд и создания новых сортов, хорошо адаптированных к различным неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам внешней среды. Известно, что скрещиваемость мягкой пшеницы с представителями других родов контролируется генами *Kr1-Kr4* (Crossability with Rye, *Hordeum* and *Aegilops* spp.) и геном *SKr* (Suppressor of crossability). Из названных генов наиболее сильное влияние на признак оказывают *SKr* и *Kr1*. В рецессивном состоянии, когда гены не функционируют, может завязываться более 50 % зерновок от числа цветков в колосе при опылении пыльцой чужеродного вида. Оба гена локализованы в хромосоме 5B. Расположение гена *SKr* в коротком плече хромосомы 5B ограничено маркерами GBR0233 и *Xgwm234* в тесном сцеплении с маркерами *Xcfb341*, TGlc2 и gene12. Ген *Kr1* расположен в длинном плече хромосомы 5B, проксимальнее гена *Ph1*, между EST-SSR-маркерами *Xw5145* и *Xw9340*. Маркеры, разработанные для гена *SKr*, применяли для контроля переноса его рецессивного аллеля *skr* в другие генотипы мягкой пшеницы, что позволило получать формы с высокой завязываемостью гибридных зерновок при скрещивании с рожью. Однако в целом использование маркеров генов *SKr* и *Kr1* в практической маркер-ориентированной селекции и молекулярном скрининге образцов *ex situ* коллекций изучено недостаточно. Большие перспективы в этом плане открывает определение полной нуклеотидной последовательности гена *Kr1* у контрастных по скрещиваемости сортов мягкой пшеницы, это дает возможность создания внутригенных аллель-специфичных маркеров. В представленном обзоре рассмотрены генетические ресурсы, созданные посредством гибридизации мягкой пшеницы с рожью; вопросы географического распространения легко скрещивающихся форм пшеницы и генетического контроля совместимости пшеницы и ржи; достижения в использовании молекулярных маркеров в картировании *Kr*-генов и контроле их передачи.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; рожь; *Kr*-гены; QTLs; молекулярное картирование; молекулярно-генетические карты; генетические ресурсы пшеницы.

Для цитирования: Поротников И.В., Антонова О.Ю., Митрофанова О.П. Молекулярные маркеры в генетическом анализе скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(6):557-567. DOI 10.18699/VJ20.649

Molecular markers in the genetic analysis of crossability of bread wheat with rye

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

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

✉ e-mail: i.v.porotnikov@gmail.com

Abstract. Bread wheat (*Triticum aestivum* L.), the varieties of which are widely used for the grain production, is difficultly crossable with related species of Triticeae Dum. This factor limits the chance of introduction of alien genetic material into the wheat gene pool and the possibility of new varieties breeding with good adaptation to adverse environmental factors. The crossability between wheat and related species is controlled by *Kr1-Kr4* genes (Crossability with Rye, *Hordeum* and *Aegilops* spp.) and the *SKr* gene (Suppressor of crossability). *SKr* and *Kr1* have the largest influence on the trait. In the case of the recessive alleles, these genes do not function and the quantity of hybrid seeds after pollination with alien species can achieve more than 50 %. *SKr* is located on 5B between the GBR0233 and *Xgwm234* markers, closely linked with the markers *Xcfb341*, TGlc2 and gene12. *Kr1* was mapped on 5BL, proximally to the *Ph1* gene, between the EST-SSR markers *Xw5145* and *Xw9340*. The markers of *SKr* were used to control the transfer of its recessive allele into other wheat genotypes, which made it possible to obtain highly crossable forms. However, the advantages of using the *SKr* and *Kr1* markers in marker-assisted selection and in the screening of *ex situ* collections are not sufficiently studied. The published *Kr1* sequence for varieties with different crossability offers great prospects, because it will be possible to create allele-specific markers. In this review,

the following issues are considered: genetic resources created by wheat and rye hybridization, the geographical distribution of easy-to-cross forms of wheat, genetic control of the wheat and rye compatibility, advances of the use of molecular markers in the mapping of *Kr*-genes and their transmission control.

Key words: *Triticum aestivum*; rye; *Kr*-genes; QTLs; molecular mapping; molecular-genetic maps; wheat genetic resources.

For citation: Porotnikov I.V., Antonova O.Yu., Mitrofanova O.P. Molecular markers in the genetic analysis of crossability of bread wheat with rye. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):557-567. DOI 10.18699/VJ20.649 (in Russian)

Введение

Пшеница – одна из важнейших сельскохозяйственных культур. В 2017 г. в мире было собрано 771.3 млн тонн ее зерна. Россия среди стран-производителей занимает третье место – 85.3 млн тонн (www.fao.org). Успехи в сборе зерна мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$, ВВААДД) и твердой пшеницы *T. durum* Desf. ($2n = 4x = 28$, ВВАА) – это результат интенсивной селекции, направленной в основном на повышение урожайности и улучшение качества зерна. Для защиты новых сортов от резких перепадов погоды, происходящих изменений в климате, действия абиотических и биотических стрессоров необходимо иметь соответствующий запас генетической изменчивости у этих культур. Однако в генофондах современных селекционных сортов такого запаса изменчивости нет. К тому же с середины прошлого столетия по всему миру имеет место процесс обеднения генетического разнообразия селекционных сортов, порожденный ходом исторического развития программ селекции и методами отбора (Porceddu et al., 1988; Kahiluoto et al., 2019). О наличии этого процесса свидетельствуют результаты анализа геномов сортов с применением SSR-маркеров во Франции (Roussel et al., 2004), Китае (Hao et al., 2006), Канаде (Fu, Somers, 2009). Чтобы защитить возделываемые пшеницы от действия различных неблагоприятных факторов, необходимо обогатить их генофонды аллелями генов, увеличивающими разнообразие адаптивных реакций. В качестве источников новых аллелей генов для пшеницы довольно широко используют другие виды родов трибы Triticeae Dum.

Одна из проблем, препятствующих успешным скрещиваниям пшеницы с представителями родов *Aegilops* L., *Hordeum* L. и *Secale* L., – наличие прогамной несовместимости (Pershina, Trubacheeva, 2017), выражающейся в замедлении или ингибировании роста пыльцевых трубок (Zeven, Van Heemert, 1970; Lange, Wojciechowska, 1976, 1977; Jalani, Moss, 1981). У мягкой пшеницы обнаружено пять генов – *Kr1*, *Kr2*, *Kr3*, *Kr4* (Crossability with Rye and *Hordeum* and *Aegilops* spp.) (McIntosh et al., 2014) и *SKr* (Suppressor of crossability) (Tixier et al., 1998), доминантные аллели которых отвечают за проявление признака несовместимости. Эти гены контролируют скрещиваемость пшеницы с видами всех названных выше родов (Snape et al., 1979; Falk, Kasha, 1981; Fedak, Jui, 1982; Sitch et al., 1985; Koba, Shimada, 1993).

Цель настоящего обзора – систематизировать сведения о генетических ресурсах, созданных с помощью межродовой гибридизации мягкой пшеницы с рожью (*Secale* L.), показать успехи в познании генетического контроля признака «легкая скрещиваемость», рассмотреть ДНК-мар-

керы, которые можно было бы использовать для быстрой и точной идентификации аллелей генов, ответственных за этот признак, и в контроле передачи их в другие генотипы.

Генетические ресурсы, созданные при скрещивании мягкой пшеницы с рожью, и их использование в селекции

Рожь посевную *Secale cereale* L. ($2n = 2x = 14$, геном R) вовлекали в скрещивания с мягкой пшеницей с конца XIX–начала XX веков (Backhouse, 1916). В 1930-х годах в Германии были получены первые формы мягкой пшеницы с транслокациями короткого плеча хромосомы 1R ржи в длинное плечо хромосомы 1В пшеницы (T1BL.1RS). В настоящее время в мире известно более 1050 сортов пшеницы, содержащих эту транслокацию, а также около 100 сортов с транслокацией T1AL.1RS (Rabinovich, 1998; Pershina, 2014; Schlegel, 2019). Широкое распространение обеих транслокаций обусловлено наличием в 1RS комплекса генов, контролирующего устойчивость к различным грибным патогенам, таким как стеблевая (*Sr31*), бурая (*Lr26*) и желтая (*Yr9*) ржавчины, мучнистая роса (*Pm8*) (Mago et al., 2005; Ren et al., 2009; Crespo-Herrera et al., 2017). Следует отметить, что большая часть сортов с транслокацией T1BL.1RS несет чужеродный хроматин от сорта ржи Petkus из Германии, а T1AL.1RS и T1DL.1RS – от Insave и Imperial соответственно (Rabinovich, 1998; Schlegel, 2019).

Ограниченное разнообразие ржаного генетического материала, очевидно, не в состоянии обеспечить устойчивость пшеницы к новым расам вредных организмов, которые стали появляться уже в 90-е годы XX в. (Porter et al., 1991; Pretorius et al., 2000). Для решения этой проблемы начали создавать линии пшеницы с новыми ржаными транслокациями путем скрещивания как с теми же сортами ржи, Petkus и Insave, (Ren et al., 2009; Tang et al., 2009), так и с новыми (Ren et al., 2012, 2017; Yang et al., 2014; Li et al., 2016). Кроме того, линию пшеницы, хорошо скрещивающуюся с рожью и несущую T1BL.1RS, использовали в гибридизации с *Secale cereale* cv. Kriszta, и за счет рекомбинации между хромосомами T1BL.1RS и 1R в пшеницу были введены новые аллели генов ржи (Molnár-Láng et al., 2010). Одна из таких рекомбинантных форм дала начало линии M9kr1-Kriszta T1BL.1RS line 179, обладающей устойчивостью к желтой и бурой ржавчинам в сочетании с высоким качеством зерна (Szakács et al., 2020). При использовании совместимых с рожью местных китайских сортов пшеницы Mianyang 11 и A42912 были также созданы линии с T1BL.1RS от разных сортов ржи, которые содержали новые эффективные аллели генов устойчивости к расам *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* и

Blumeria graminis f. sp. *tritici* (Ren et al., 2012, 2017; Yang et al., 2014; Li et al., 2016). Передача генетического материала хромосомы 2R ржи в пшеницу сопровождалась переносом генов устойчивости к бурой (*Lr25* и *Lr45*) и стеблевой (*Sr59*) ржавчинам, повышением адаптивности растений к засушливым условиям климата (Ehdaie et al., 2003). В хромосомах 5RL и 7R обнаружены гены, повышающие эффективность усвоения меди и цинка из почвы (Owuochi et al., 1996; Sakmak et al., 1997). Наиболее полный перечень всех известных пшенично-ржаных транслокаций и генов устойчивости приведен в обзоре (Crespo-Herrera et al., 2017). Следует отметить, что в настоящее время потенциал генетического разнообразия, заключенный в хромосомах ржи, помимо 1R, в селекции пшеницы практически остался неиспользованным (Schlegel, 2019).

Считаем нужным подчеркнуть, что в разные периоды времени на базе коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) также проводили исследования по скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью. Признак «легкая скрещиваемость пшеницы с рожью» был целенаправленно передан в озимый сорт Прикульская 481, на его основе созданы легко скрещивающиеся линии (Суриков, Киссель, 1980), которые наряду с другими линиями использовали в гибридизации с дву- и шестирядными формами ячменя для получения различных межродовых гибридов (Суриков, Киссель, 1987). Созданы оригинальные, хорошо совместимые с разными видами ржи формы озимой мягкой пшеницы AM 808 (с привлечением к-48253 Arthur, США) и MA 808 (к-43920 Мироновская 808, УССР), которые при опылении рожью давали жизнеспособные гибридные и частично фертильные растения F₁ (Рехметулин, 1988). Возможность получения частично фертильных гибридных растений и от них константных первичных высокопродуктивных зимостойких пшенично-ржаных линий подтверждена и в наши дни, при этом методом геномной *in situ* гибридизации у всех линий обнаружены элиминация хромосом генома D и наличие полных геномов B, A и R (Pyykkinen et al., 2019).

Факторы, влияющие на уровень скрещиваемости пшеницы с рожью

Большая работа по обобщению имеющихся в литературе сведений и результатов собственных исследований по скрещиваемости сортов/линий преимущественно мягкой пшеницы с рожью выполнена А.С. Zeven (1987). На основании собранных нами данных (см. таблицу) можно заключить, что мягкая пшеница в целом плохо скрещивается с рожью. Легко (хорошо) скрещивающиеся формы находили с частотой 5.9 %, причем в определенных географических регионах (Lein, 1943; Писарев, 1960; Ригин, 1976; Lange, Wojciechowska, 1976; Falk, Kasha, 1981; Zeven, 1987). Так, выполненная в ВИР оценка сортов мягкой пшеницы различных агроэкологических групп показала, что наиболее высокую способность завязывать гибридные зерновки (52.5 и 53.7 % соответственно) имели сорта китайского и восточносибирского экотипов (Писарев, 1960; Ригин, 1976). Считают, что частое выявление хорошо скрещивающихся форм среди восточноазиатских сортов пшеницы, возможно, связано с тем, что в процессе эволюции у них не сформировалась генетическая система, препятствующая скрещиваемости пшеницы с рожью, поскольку ареал ржи был ограничен исключительно районами Европы и Западной Азии, и с этой культурой пшеница в Юго-Восточной Азии вместе не произрастала (Lein, 1943; Riley, Chapman, 1967).

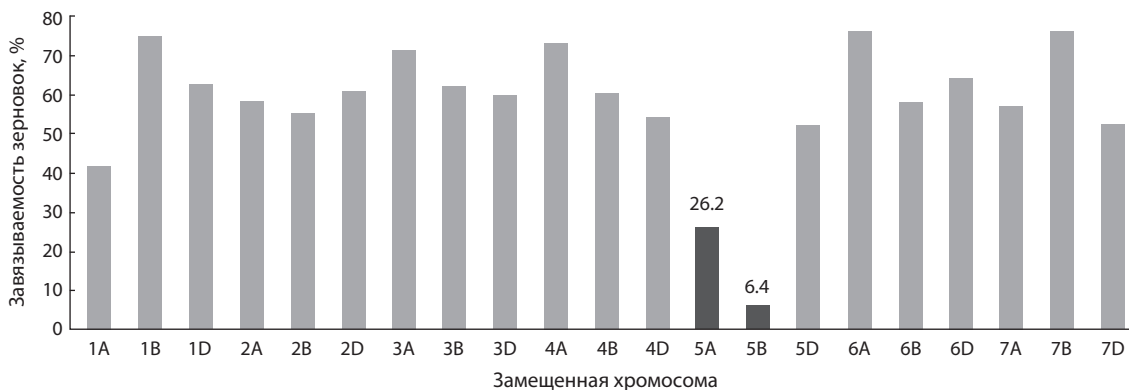
Показано, что на успех скрещиваемости пшеницы с рожью также влияет целый ряд факторов, в том числе видовая принадлежность отцовских и материнских генотипов. Наиболее высокий процент завязываемости гибридных зерновок наблюдали у гексаплоидных пшениц: *T. aestivum*, *T. spelta* L., *T. compactum* Host; средний – у тетраплоидных *T. turgidum* L., *T. durum*, и самый низкий – у диплоидных *T. monococcum* L. и *T. boeoticum* Boiss. Варьировала также успешность применения разных видов ржи в качестве опылителей: высокая скрещиваемость при опылении пылью диплоидных видов *S. cereale* и *S. vavilovii* Grossh., низкая – тетраплоидного вида *S. fragilis* M. Bieb. (Ригин, 1965, 1976; Суриков, Киссель, 1985;

Распределение образцов пшеницы по эффективности образования гибридных зерновок при опылении рожью

Уровень завязываемости гибридных зерновок, %				Всего образцов	Лит. источник
0–10	10–30	30–50	50 и более		
48	2	–	–	50	Рехметулин, 1987
97	14	6	9	126	Ригин, 1976
3	3	1	10	17	Суриков, Киссель, 1985
105	20	1	5	131	Zheng-Song et al., 1998
53	3	3	2	61	Singh, Sethi, 1991
29	23	11	34	97	Rui et al., 1995
577	27	4	6	614	Zeven, 1987
477	67	29	34	607	Zeven, 1987*
1389	159	55	100	1703	Всего
81.6	9.3	3.2	5.9	100	Доля от общего числа образцов, %

Примечание. Интервалы для распределения сортов по группам взяты из классической работы А. Lein (1943).

* Образцы из других литературных источников, цитируемые в работе А.С. Zeven (1987).



Скрещиваемость с рожью линий мягкой пшеницы с межсортовым замещением хромосом серии Chinese Spring/Hope, по данным (Riley, Chapman, 1967).

Рехметулин, 1987; Molnár-Láng, 2015). Различные аспекты проблемы скрещиваемости пшеницы с рожью и другими видами рассмотрены в обзорной статье (Molnár-Láng, 2015).

Гибридологический анализ скрещиваемости пшеницы с рожью и локализация генов легкой скрещиваемости

Первые сведения о наследовании признака «легкая скрещиваемость мягкой пшеницы с рожью» получены немецким ученым А. Lein (1943). Выяснение характера наследования признака у рецессивных гибридов F_1 – F_3 между сортом Chinese 466 из Аргентины, характеризующимся высокой (57.3 %) завязываемостью гибридных зерновок, и плохо скрещивающимися с рожью сортами Marguis (Канада), Peragis и Blausamtiger Kolben (Германия) с завязываемостью 1.9, 2.5 и 12.7 % соответственно, показало в F_1 доминирование низкой завязываемости, а в F_3 – дигибридное расщепление. Аллельные пары факторов (генов) были обозначены как *Kr1-kr1* (Kreuzbarkeitsgene) и *Kr2-kr2*, а генотипы родительских сортов – *kr1kr1kr2kr2* (Chinese 466), *Kr1Kr1Kr2Kr2* (Marquis и Peragis) и *Kr1Kr1kr2kr2* (Blausamtiger Kolben). Отмечено также, что доминантный аллель *Kr1* обладает более сильным ингибирующим эффектом роста пыльцевых трубок, чем *Kr2*, а различные генотипы характеризуются следующим процентом завязываемости гибридных зерновок: *Kr1Kr1Kr2Kr2* – до 10 %, *Kr1Kr1kr2kr2* – 10–30, *kr1kr1Kr2Kr2* – 30–50, *kr1kr1kr2kr2* – более 50 % (Lein, 1943).

Для установления хромосомной локализации генов *Kr1* и *Kr2* была использована серия из 21 линии с межсортовым замещением хромосом Chinese Spring/Hope (Sears et al., 1957; Riley, Chapman, 1967). При опылении диплоидной рожью у Chinese Spring (далее CS) наблюдали высокую (74.3 %) завязываемость гибридных зерновок, а сорт Hope таких зерновок практически не образовал. Существенное снижение уровня завязываемости зерновок обнаружено у линий с замещенными хромосомами 5A и 5B, хотя различия между линиями не имели статистического подтверждения (см. рисунок). Полученные данные навели R. Riley и V. Chapman на мысль, что замена хромосом 5B вызывает большую редукцию уровня скрещиваемости, чем хромосом 5A. Ген *Kr1* был локализован

в хромосоме 5B, а *Kr2* – в 5A (Riley, Chapman, 1967). Чтобы ответить на вопрос, рецессивные аллели *Kr*-генов поддерживают межродовую совместимость или, напротив, доминантные аллели ингибируют скрещиваемость, авторы процитированной работы протестировали линию CS nulli-5B-tetra-5D, у которой отсутствовали хромосомы 5B, но присутствовала в учетверенной дозе гомеологичная ей хромосома 5D. Эта линия, как и моносомик CS по хромосоме 5B, формировала зерновки при самоопылении. При опылении рожью в первом случае 116 цветков дали 67 гибридных зерновок (завязываемость 57.8 %), во втором – при опылении 261 цветка было получено 184 зерновки (70.5 %). Отсутствие хромосом 5B и, соответственно, пары рецессивных аллелей *kr1* или изменение их дозы не снижало уровень завязываемости гибридных зерновок. Из этого R. Riley и V. Chapman сделали вывод, что рецессивные аллели не активны, доминантные аллели гена *Kr1* действуют как ингибиторы скрещиваемости. Поскольку линии CS/Hope 5A и CS/Hope 5B, в отличие от сорта Hope, не теряли полностью способности образовывать гибридные зерновки при опылении рожью, эффекты ингибиторов *Kr1* и *Kr2*, по мнению этих ученых, были или аддитивными, или комплементарными.

Нужно отметить, что о возможном кумулятивном действии генов *Kr1* и *Kr2* ранее сообщил А. Lein (1943): гетерозиготные генотипы *Kr1kr1kr2kr2* и *kr1kr1Kr2kr2* имели более 10 % успешных скрещиваний с рожью, тогда как часть растений с генотипами *Kr1Kr1Kr2kr2* и *Kr1kr1Kr2Kr2* не завязала ни одной гибридной зерновки. Впоследствии это предположение подтвердили результаты работы (Falk, Kasha, 1983), было отмечено также, что рецессивные аллели *kr1* и *kr2* кумулятивным эффектом не обладали.

Для картирования гена *Kr1* в хромосоме 5B использовали гибриды, полученные от скрещивания замещенной линии CS/Hope 5B, имеющей низкую завязываемость зерновок при опылении рожью, с дителосомной линией CS DT5BL, у которой хромосома 5B была представлена парой телосоматриков по ее длинному плечу, а короткое плечо отсутствовало (Lange, Riley, 1973). По способности завязывать гибридные зерновки эта линия не отличалась от сорта CS. Средняя частота рекомбинации между *Kr1* и центромерой составила 11.45 ± 3.0 %. Локализацию гена *Kr1* в длинном плече хромосомы 5B подтвердили

L.A. Sitch с коллегами (1985), однако ген располагался на большем расстоянии от центромеры – 44.8 ± 3.28 % рекомбинации. Причиной такого несоответствия могло быть использование другой родительской формы – сорта Highbury.

Ген *Kr2* картировали у гибридов, полученных от скрещивания CS с линией CS/*T. spelta* 5A, у которой пара хромосом 5A мягкой пшеницы замещена на пару хромосом 5A от *T. spelta* (Sitch et al., 1985). Ген *Kr2* оказался тесно сцепленным (частота рекомбинации 4.8 ± 4.66 %) с геном *Vrn1* (Response to Vernalization), определяющим яровой тип развития растений пшеницы, и был расположен дистальнее гена *Q* (Squarehead/spelt), обуславливающего образование спельтоидного типа колоса (McIntosh et al., 2014), на расстоянии 38.1 ± 10.60 % рекомбинации от него (Sitch et al., 1985). Примерно одинаковое положение *Kr1* и *Kr2* по отношению к центромере авторы рассматривали как доказательство в пользу гомеоаллельности этих генов. Кроме того, в данной работе статистически значимые различия по завязываемости гибридных зерновок были выявлены у эуплоидных растений сорта CS и у полученных на его основе моносомиков моно-5B и дителосомных линий DT5BL. Эуплоидные растения CS завязывали в два раза меньше зерновок, чем растения двух упомянутых линий. Этот эффект L.A. Sitch с коллегами (1985) связали с уменьшением дозы короткого плеча хромосомы 5B и предположили присутствие в нем супрессора скрещиваемости. Позднее наличие такого супрессора, получившего название *SKr* (Suppressor of crossability), было доказано методами молекулярно-генетического картирования (Tixier et al., 1998).

Еще один ген, *Kr3*, был картирован у гексаплоидной пшеницы в хромосоме 5D (Krolow, 1970). У доминантного аллеля этого гена эффект ингибирования скрещиваемости был слабее, чем у *Kr1* и *Kr2*. При гибридизации с рожью влияние *Kr3* зачастую оказывалось статистически незначимым, и в ряде работ (Riley, Chapman, 1967; Falk, Kasha, 1983; Sitch et al., 1985; Zheng et al., 1992) участие хромосомы 5D в контроле завязываемости пшенично-ржаных гибридных зерновок не подтверждено. Однако действие *Kr3* как ингибитора межродовой совместимости удалось продемонстрировать при гибридизации с *Hordeum bulbosum* L. на линиях CS/Норе 5D и CS/Норе 5A, получивших от сорта-донора Норе хромосомы с доминантными аллелями генов *Kr3* и *Kr2* соответственно (Snare et al., 1979). Снижение скрещиваемости с *H. bulbosum* у этих замещенных линий было примерно одинаковым, т.е. эффект гена *Kr3* был равен эффекту гена *Kr2*.

Ген *Kr4* обнаружен моносомным анализом линии мягкой пшеницы J-11 из провинции Сычуань (Китай). Эта линия показала почти 100 % завязываемость гибридных зерновок при опылении рожью (Zheng et al., 1992). Наследование признака хорошей скрещиваемости изучали у гибридов F_1 между линией J-11 и моносомными линиями сортов Abbondanza (скрещиваемость с рожью менее 2.13 %, предположительный генотип *Kr1Kr1Kr2Kr2*) и Chinese Spring (генотип *kr1kr1kr2kr2*). В первом случае присутствие хромосом 1A, 5A и 5B от линии J-11 оказывало положительное влияние на успех скрещивания с рожью, в то время как у гибридов с моносомниками CS

для тех же хромосом наблюдали снижение скрещиваемости. При этом влияние хромосомы 1A на завязываемость зерновок оказалось сильнее, чем 5A (*kr2*), но слабее, чем 5B (*kr1*). Это позволило Y.L. Zheng с коллегами (1992) сделать вывод о наличии в хромосоме 1A линии J-11 дополнительного гена *kr4*, сходного по действию с *kr1* и *kr2*. Точная хромосомная локализация *kr4* пока остается неизвестной.

Молекулярно-генетическое картирование гена *SKr* и поиск локусов, влияющих на уровень скрещиваемости пшеницы с рожью

Новые возможности для точной локализации генов легкой скрещиваемости пшеницы с рожью возникли в связи с введением в генетический анализ технологии молекулярного маркирования и созданием насыщенных молекулярно-генетических карт (Xie et al., 1993; Nelson et al., 1995; Cadalen et al., 1997; Röder et al., 1998; Somers et al., 2004; Leonova, 2013; Khlestkina, 2014). Результаты работ разных исследователей по молекулярным маркерам и картам хромосом мягкой пшеницы и других видов трибы Triticeae доступны в цифровой базе данных GrainGenes (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>).

Основополагающая работа по определению локусов количественных признаков (QTLs), влияющих на скрещиваемость, выполнена с использованием маркеров RFLP на популяции из 187 ДН-линий, производных от гибрида CS×Courtot (Tixier et al., 1998). Скрещиваемость родительских форм и всех ДН-линий проверяли путем опыления пыльной ржи сорта Dankowskie Nowe, высокий уровень скрещиваемости был подтвержден для CS (95 %, генотип *kr1kr1kr2kr2*), низкий – для Courtot (10 %, *Kr1Kr1kr2kr2*) (Gay, Bernard, 1994). Для локализации в хромосомах QTLs, оценки их аддитивных эффектов и эффектов доминирования М.Н. Тихер с коллегами (1998) применяли метод логистической линейной регрессии, который приложим к линиям, полученным от F_1 путем самоопыления или бек-кроссирования, и ДН-линиям, при условии, что имеется информация об их генотипах по RFLP, RAPD или другим типам маркеров (Kearsey, Hуne, 1994). О местоположении QTLs судили по отношению величины аддитивного эффекта к фенотипической дисперсии:

$$avp = a^2/\sigma_p^2,$$

где a – аддитивный эффект, σ_p^2 – фенотипическая дисперсия, p – вероятность успешного скрещивания.

Всего в хромосомах 5B и 7A у ДН линий было обнаружено три локуса от сорта Courtot, подавляющие способность скрещиваться с рожью. При этом в хромосомах 5A (*Kr2*) и 5D (*Kr3*) таких локусов не найдено. Главный локус ($avp = 16.8$ %) находился в дистальном районе короткого плеча хромосомы 5B вблизи маркера *Xfba367*, который имел наибольший аддитивный эффект ($a = 13.6$) и был тесно сцеплен (2.5 cM) с маркером *Xpsr170*. Другой локус, ассоциированный с маркером *Xtam51* (хромосома 7AL), оказывал значительный аддитивный эффект ($a = 8.1$) при рассмотрении его в модели вместе с *Xfba367*. Еще один QTL, влияющий на скрещиваемость и, по-видимому, относящийся к гену *Kr1*, был картирован в длинном плече хромосомы 5B и фланкирован RFLP-

маркером *Xwg583* ($a = 6.1$; $avp = 3.3$ %) и SSR-маркером *Xgwm271*. Этот QTL оказывал более слабое влияние на фенотипическое проявление признака, для расчета его эффекта понадобилось привлечь методы маркерной логистической регрессии с двумя QTL в хромосоме 5B (Tixier et al., 1998).

Ранее в процедурах по картированию *Kr*-генов изучали расщепление в потомствах гибридов от скрещивания дителосомной по длинному плечу хромосомы 5B линии CS (*kr1kr1*) с замещенной линией CS/Норе 5B или сортом Highbury, имеющими доминантные аллели гена *Kr1*, и рассчитывали частоту рекомбинации между *kr1* и центромерой. Влияние короткого плеча хромосомы 5B CS на скрещиваемость не обнаружено (Lange, Riley, 1973; Sitch et al., 1985). Однако в работе L.A. Sitch с коллегами (1985) показано, что уменьшение дозы 5BS сопровождалось повышением уровня скрещиваемости CS с *H. bulbosum*. Выявление у гибрида CS×Courtot в коротком плече 5B локуса, существенно влияющего на уровень скрещиваемости с рожью, дало основание предположить наличие у сорта Courtot еще одного доминантного гена, подавляющего межродовую гибридизацию. Ген-супрессор был обозначен как *SKr* (Suppressor of crossability) (Tixier et al., 1998). Работа по его молекулярному картированию выполнена D. Lamoueux с коллегами (2002). Анализ QTLs проводили на основе тех же фенотипических данных, что были получены M.H. Tixier с коллегами (1998), но для картирования использовали преимущественно маркеры AFLP. Молекулярная карта хромосомы дистального участка 5BS была увеличена на 16.1 сМ путем интегрирования маркеров E36M49-287 (после секвенирования назван *Xdl103*) и E32M61-233. Несколько маркеров были также интегрированы в хромосомную карту 5B в район центромеры. Анализ подтвердил наличие в 5BS главного QTL ($a = 15.9$ %; $avp = 22.1$ %), ингибирующего скрещиваемость с рожью, который наиболее вероятно расположен на участке размером в 5.1 сМ между маркерами *Xdl103* и *Xfba367* и на расстоянии 12.7 сМ от дистального конца хромосомы. Поиск областей, ортологичных гену *SKr*, был проведен посредством скрининга библиотеки ВАС-клонов риса с помощью зондов *Xpsr170* и *Xdl103* (клонированный маркер AFLP E36M49-287), картированных вблизи *SKr*. В хромосомах 5 и 6 генома риса обнаружены QTLs с функциями, близкими к *SKr*, в том числе: локус f_5 , ответственный за фертильность (Wang et al., 1998), локус S_5 , контролирующей стерильность у межсортовых гибридов (Liu et al., 1997), а также локус S_{10} , детерминирующий мужскую стерильность (Lorieux et al., 2000).

Создание насыщенной генетической карты для района хромосомы 5BS с геном *SKr* получило продолжение в работе W. Alfares с коллегами (2009). Они изучали популяцию линий-потомков F_6 от самоопыления гибридов MP98×Courtot. Родительская линия MP98 была отобрана по признаку высокой скрещиваемости с рожью (70 ± 11.3 %) из популяции дигаплоидов гибрида CS×Courtot (Tixier et al., 1998; Lamoueux et al., 2002). Для картирования были применены новые маркеры из опубликованных баз данных: для хромосомы 5BS было взято восемь маркеров, детектирующих полиморфизм у родительских форм, включая микросателлиты *Xgwm234*, *Xgpw4098*,

Xwmc149 и *Xgwm443*, все они располагались проксимально по отношению к гену *SKr* (Alfares et al., 2009). Среди них *Xgwm234* был локализован довольно близко к *SKr* (0.2 сМ). Для насыщения карты и поиска маркеров в дистальной области привлекли дополнительные маркеры с EST-карты генома ячменя (Stein et al., 2007) как наиболее родственного пшенице злака. В результате были найдены два EST-маркера, GBR0233 и GBR1541, картированные как RFLP-зонды дистально и проксимально от *SKr* соответственно.

Секвенированная последовательность маркера GBR0233 оказалась гомологична участку гена риса *Os12g44150* (хромосома 12L) (Alfares et al., 2009), который, в свою очередь, относится к группе генов *Os12g44180–Os12g44250*, идентифицированных в другой работе как гомологи гена *GSP* (Grain softness protein = белок мягкозерности зерновки) мягкой пшеницы (Chantret et al., 2004). На основе последовательности ВАС клона 1793L02 (GenBank #CT009585), содержащего ген *GSP*, авторы разработали сцепленные с геном *SKr* SSR-маркеры *Xcfb306* и *Xcfb309*. Кроме того, последовательность RFLP-маркера GBR0233 проявляла гомологию с двумя EST-контингами мягкой пшеницы, один из которых, CTG_WHP_856.1-G356.103K22R011024, содержал специфичную для хромосомы 5B последовательность ATPase1-5B, для ее детекции также была разработана пара праймеров (Alfares et al., 2009).

Маркеры *Xcfb306*, *Xcfb309*, ATPase1-5B применяли для скрининга библиотеки ВАС-клонов сорта CS. Были выделены ВАС-клоны, 2163O14 и 317L24A, расположенные проксимально и дистально по отношению к области *SKr* соответственно. Секвенирование этих клонов дало информацию для разработки дополнительных ISBP- и SSR-маркеров. Определены 5B-специфичные SSR-маркеры *Xcfb341* и *Xcfb382*, тесно сцепленные с локусом *SKr*. Таким образом, ген *SKr* был картирован в интервале 0.1 сМ с тесно сцепленными SSR-маркерами *Xcfb306*, *Xcfb382*, *Xcfb341* и фланкирован в промежутке 0.3 сМ между GBR0233 (проксимальное положение) и *Xgwm234* (дистальное положение) (Alfares, 2009; Alfares et al., 2009). Позднее была показана достоверная ассоциация гена *SKr* и маркеров *Xcfb341*, TGlc2 (ISBP), gene12 и gene13, последние два получены на основе ортологичных генов риса *Os12g44100-1* и *Os12g44090* соответственно (Bouguennec et al., 2018). Маркеры *Xcfb306* и *Xcfb341* использовали при картировании гена *SKr* и в других популяциях, например популяции F_2 (Renan×CS) (Alfares et al., 2009), а также для молекулярно-генетического картирования хромосомы 5B (Timonova et al., 2013).

Другая попытка картирования генов легкой скрещиваемости мягкой пшеницы с рожью предпринята в работе японских исследователей (Mishina et al., 2009). Для картирования использовали рекомбинантные по хромосоме 5B инбредные линии (CS×CS/Cheyenne5B) и 81 SSR-маркер из работы D.J. Somers с коллегами (2004) и интернет-ресурса Wheat composite 2004 map at GrainGenes 2.0 (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Включение в анализ описанных ранее маркеров *Xcfb341* и *Xgwm234* (Tixier et al., 1998; Lamoueux et al., 2002; Alfares et al., 2009) не дало положительных результатов из-за отсутствия полиморфизма у родительских форм. В этой популяции основной по силе

QTL (*SKr*) был тесно сцеплен с SSR-маркером *Xgwm443* хромосомы 5B и ограничен генетическими локусами *Xcfd5* и *Xbarc216* (интервал 50 сМ), расположенными дистально и проксимально соответственно (Mishina et al., 2009). Список молекулярных маркеров, сцепленных с геном *SKr*, приведен в Приложении¹.

Возможность практического использования маркеров гена *SKr* в маркер-ориентированной селекции (marker assisted selection, MAS) продемонстрирована в работах (Alfares et al., 2009; Vouguennec et al., 2018). Так, на этапах получения гибридов от скрещивания линии Ct(FK5B), у которой пара хромосом 5B Courtot была замещена на пару гомологов от японского сорта Fukuho Komugi, имеющего хорошую скрещиваемость, с шестью сортами мягкой пшеницы с плохой скрещиваемостью и проведения беккроссов BC₂F₂ наличие/отсутствие рецессивных аллелей *skr* контролировали с помощью маркеров *Xcfb306* и *Xcfb341*. Практически все гибридные линии показали полное соответствие между наличием диагностических фрагментов маркеров *Xcfb306* и *Xcfb341* и ожидаемым уровнем скрещиваемости с рожью (Alfares et al., 2009).

В работе A. Vouguennec с коллегами (2018) для контроля передачи рецессивных аллелей *skr* от двух линий, полученных W. Alfares с коллегами (2009), в сорт пшеницы Barok использовали как уже известные SSR-маркеры *Xcfb306*, *Xcfb341* и *Xgwm234*, так и в дополнение к ним новые разработанные маркеры TGlc2 (ISBP), gene12 и gene13. Маркеры TGlc2, *Xcfb341* и gene12 косегрегировали с *SKr*. На каждом этапе скрещиваний (до BC₃F₂) гибридные формы тестировали на наличие молекулярных маркеров, благодаря чему подтвердили возможность их использования в контроле передачи рецессивного аллеля *skr* в другие сорта. Кроме того, диагностическая эффективность маркеров *Xcfb341*, TGlc2 gene12 и gene13 была проверена при генотипировании 15 сортов и линий мягкой пшеницы различного географического происхождения. По результатам молекулярного скрининга, 11 из них (12 по маркеру gene13) имели правильную ассоциацию «маркер-признак», а для четырех сортов с плохой скрещиваемостью (трех в случае gene13) соотнести признак и диагностические фрагменты маркеров не удалось – продукты амплификации у них по размеру соответствовали аллелю «легкой скрещиваемости» (Vouguennec et al., 2018).

Молекулярно-генетическое картирование гена *Kr1*

Сначала местоположение гена *Kr1* было определено на расстоянии 20 сМ от гена-супрессора гомеологичного спаривания хромосом *Ph1*, расположенного в проксимальной области хромосомы 5BL (Snare et al., 1995). По результатам последующих исследований (Lamougeux et al., 2002) *Kr1* был локализован на расстоянии 90.3 сМ от дистального конца 5BL между маркерами E33M60-233 (AFLP) и *Xgwm271* (SSR), при этом наблюдали независимое расщепление потомства по генам *Kr1* и *SKr*. Эффект QTL, который был соотнесен с *Kr1*, оказался намного слабее ($a = 7.9\%$; $avp = 5.5\%$) эффекта *SKr* ($a = 15.9\%$; $avp = 22.1\%$).

Для уточнения локализации гена *Kr1* I. Bertin с коллегами (2009) использовали популяцию рекомбинантных линий, полученных от скрещивания сорта Hobbit sib, несущего реципрокно-транслоцированные плечи хромосом 5BL-7BL и 5BS-7BS, с замещенной линией Hobbit sib (CS 5BL, 7BL), у которой длинные плечи хромосом 5B и 7B были замещены на гомологи от CS. Показано, что *Kr1* расположен в области 13 сМ между SSR-маркерами *Xgwm213* и *Xgwm371*. С помощью этих маркеров у мутантной линии *ph1b* подтверждена локализация вблизи *Ph1* гена *Kr1*. Сведения о локализации *Ph1* и установленная синтения содержащего его участка по отношению к хромосомам 9 риса и Bd4 коротконожки *Brachypodium distachyon* L. позволили привлечь новые маркеры для тонкого картирования *Kr1* и выявить два локуса, влияющих на скрещиваемость с рожью. Один из них расположен проксимально к гену *Ph1* на расстоянии не более 2 сМ и фланкирован EST-SSR-маркерами *Xw5145* (дистальное положение) и *Xw9340* (проксимальное положение). Этот район также включает SSR-маркер *Xgwm213*, ранее примененный для картирования *Kr1*. Другой участок – *Crossability region 2*, расположенный дистально от *Ph1*, оказался более важным для тонкого картирования, поскольку имел выше уровень рекомбинации, а также синтению с участком хромосомы Bd4 у *B. distachyon* размером 2.5 Мб. Участок *Crossability region 2* ограничен в интервале 14 сМ EST-SSR-маркерами 1275L15_cg3 и Os09g38060 и включает SSR-маркер *Xgwm371*. Линии с рекомбинацией по этому участку могли скрещиваться с рожью даже при наличии доминантных аллелей гена *Kr1*. Нужно отметить, что первоначально картирование *Kr1* на участке в 13 сМ между SSR-маркерами *Xgwm213* и *Xgwm371* не позволило доказать присутствие второго локуса. Перечень молекулярных маркеров, сцепленных с локусами *Kr1* и *Crossability region 2*, представлен в Приложении.

В настоящее время удалось определить нуклеотидную последовательность доминантного (от сорта Mazhamai) и рецессивного (от CS) аллелей гена *Kr1*. Основой для этого послужили работы японских исследователей (Manickavelu et al., 2009a, b), изучивших экспрессию генов в тканях пестиков у рекомбинантных инбредных линий, различающихся по скрещиваемости с рожью, при этом впервые получены дифференциально экспрессированные фрагменты кДНК (differentially expressed fragment, DEF), среди которых, возможно, были фрагменты гена *Kr1*. Путем сравнения полученных DEF-последовательностей с последовательностями баз данных генбанков DDB Blastx и NCBI Blast обнаружены по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, относящиеся к гену *Kr1*. Фрагмент DEF1 (#AB289691) был идентифицирован как гомолог гена *ZmPtila*, который входит в группу PTK1-подобных киназ кукурузы (Pti1-like kinases) и участвует в стимулировании прорастания пыльцевых трубок. Последовательность DEF2 (#AB379558.1) была гомологична гену кальций-зависимой протеинкиназы риса – CDPK (Calcium-dependent protein kinase) – белку, участвующему в передаче различных стресс-чувствительных сигналов при развитии цветка (Manickavelu et al., 2009a, b).

На основе опубликованной последовательности кДНК гена *Kr1* (#AB379558.1) китайские ученые с помощью

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx7.pdf>

специфичных праймеров амплифицировали фрагменты этого гена у трех сортов пшеницы (Cai et al., 2012). Полученные последовательности на 85 % были гомологичны гену *SRK* (S-locus receptor kinase) (Stein et al., 1991), который экспрессируется в тканях пестика и отвечает за распознавание пыльцы у вида *Brassica oleracea* L. Наряду с другими генами *S*-локуса, *SRK* участвует в контроле совместимости рыльца пестика с чужеродной пыльцой.

На базе той же частичной последовательности гена *Kr1* (#AB379558.1) были разработаны наборы праймеров, позволившие провести полное секвенирование этого гена с помощью методов прогулки по геному (Genome walking) и быстрой амплификации концов кДНК (Rapid amplification of cDNA ends) (Cai et al., 2016). У плохо скрещивающегося с рожью сорта Mazhamai (*Kr1*/–) последовательность гена имеет длину 4006 п. н. и содержит три интрона, четыре экзона общей длиной 1671 п. н., которые кодируют 557 аминокислот. У сорта CS (*kr1/kr1*) последовательность гена короче (3945 п. н.) и только на 56.24 % гомологична доминантной аллели. Основные отличия рецессивного аллеля от функционального отмечены в третьем и четвертом экзонах, которые у *kr1* содержат большое количество стоп-кодона, что указывает на невозможность его экспрессии.

Другие гены скрещиваемости пшеницы с рожью

Все описанные выше гены и QTLs, ответственные за скрещиваемость с рожью, характерны для мягкой пшеницы. Синтетическая гексаплоидная пшеница имеет тот же геномный состав, что и мягкая, но обладает куда более широким генетическим разнообразием, поскольку для ее получения в качестве родительских форм привлекают различных представителей тетраплоидных пшениц ($2n = 4x = 28$, ВВАА) и вида *Ae. tauschii* (Хакимова и др., 2019). Это позволяет предположить, что у синтетической пшеницы могут присутствовать другие локусы, эффект которых будет схож с генами семейства *Kr*.

Действительно, такие гены обнаружены у синтетической гексаплоидной пшеницы Am3, полученной путем гибридизации пшеницы карталинской *T. carthlicum* Nevski = *T. persicum* Vav. с *Ae. tauschii* (Zhang et al., 2011). После скрещивания Am3 с китайским сортом пшеницы Laizhou953 при последующем многократном беккроссировании и самоопылении гибридов популяция из интрогрессивных линий BC₅F₆ была подвергнута молекулярному скринингу с использованием 1256 SSR-маркеров. Всего было найдено 13 QTL, для 5 из них, *QCa.caas.1A*, *QCa.caas.2D*, *QCa.caas.4B*, *QCa.caas.5B* и *QCa.caas.6A*, влияние на скрещиваемость установлено в обеих провинциях. Наиболее сильный локус *QCa.caas.5B* в хромосоме 5BS был сцеплен с SSR-маркером *Xwmc149* (унаследован от *T. carthlicum*), что позволило ассоциировать его с геном *SKr*. Дополнительные локусы отмечены в хромосомах 1A, 2D, 4B и 6A. Локус *QCa.caas.1A*, полученный также от пшеницы карталинской и фланкированный SSR-маркерами *Xbarc213* (проксимальный) и *Xbarc287* (дистальный) в интервале 10 сМ в коротком плече хромосомы 1A, интересен тем, что он может относиться к *Kr4*. Как утверждают L. Zhang с коллегами

(2011), три других локуса – *QCa.caas.2D* (унаследован от *Ae. tauschii*), *QCa.caas.4B* и *QCa.caas.6A* (унаследованы от Laizhou953) – были открыты впервые.

Заключение

Насущная необходимость обогащения генофонда пшеницы новыми аллелями генов, прежде всего контролирующими различные адаптивные реакции растений, стимулирует проведение исследований по поиску новых форм, легко скрещивающихся с представителями родов *Secale*, *Aegilops* и *Hordeum*, а также по изучению генетики межродовой совместимости. Полученные новые знания о генетической природе признака «легкая скрещиваемость» напрямую связаны с введением в генетический анализ разных типов молекулярных маркеров, построением насыщенных генетических карт хромосом пшеницы, молекулярно-генетическим картированием *Kr*-генов и идентификацией QTLs, влияющих на успех межродовой гибридизации, созданием доступного для изучения исходного материала и формированием общего информационного банка данных.

В настоящее время на молекулярно-генетических картах локализованы гены *SKr* и *Kr1* и разработано значительное число ассоциированных с ними маркеров. Однако примеры применения этих маркеров в маркер-ориентированной селекции пока немногочисленны. Как сообщается в литературе, с определенной долей успеха эффективны тесно сцепленные и косегрегирующие с геном *SKr* маркеры TGlс2, *Xcfb341* и gene12. В качестве дополнительных маркеров могут выступать gene13, *Xcfb306* и *Xgwm234*. С их помощью удалось отследить интрогрессию участка хромосомы, ассоциированного с легкой скрещиваемостью, в отдельные сорта пшеницы, что во многом ускорило процесс создания желаемых форм. Эффективность маркеров, сцепленных с геном *Kr1* и районом *Crossability region 2*, в контроле такой передачи, а также для скрининга *ex situ* коллекций пшеницы только предстоит проверить. Большие перспективы открываются в связи с опубликованной недавно полной нуклеотидной последовательностью гена *Kr1*, что дает возможность разработки внутригенных аллель-специфичных маркеров.

Поиск генов легкой скрещиваемости с рожью продолжается. Примером может послужить синтетическая гексаплоидная пшеница Am3, где с помощью молекулярных маркеров обнаружено три новых QTL. Созданные путем гибридизации пшеницы с рожью разного типа генетические линии, сорта, содержащие транслокации и интрогрессии с чужеродными аллелями генов, формируют ценный ресурс для проведения научных исследований и селекции.

Список литературы / References

- Писарев В.Е. Амфидиплоиды «яровая пшеница × яровая рожь». *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 1960;32(2):37-55.
[Pisarev V.E. Amphidiploids “spring wheat × spring rye”. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selekcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1960;32(2):37-55. (in Russian)]
Рехметулин Р.М. Скрещиваемость аргентинских сортов яровой мягкой пшеницы с диплоидной и тетраплоидной рожью. *Сб. науч. тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 1987;111:77-81.

- [Rekhetulin R.M. Crossability in Argentine spring soft wheat varieties with diploid and tetraploid rye. *Bulletin of Applied Botany, Genetics, and Plant Breeding*. 1987;111:77-81. (in Russian)]
- Рехметулин Р.М. Использование форм мягкой пшеницы AM 808 и MA 808 в скрещивании с рожью. *Докл. ВАСХНИЛ*. 1988;9:7-10. [Rekhetulin R.M. Use of soft wheat forms AM 808 and MA 808 in crosses with rye. *Doklady VASKhNIL = Reports of the Academy of Agricultural Sciences*. 1988;9:7-10. (in Russian)]
- Ригин Б.В. Скрещивание разноросомных групп пшеницы и *Triticale* с рожью. *Сб. тр. аспирантов и молодых научных сотрудников*. Ленинград, 1965;6(10)27-35. [Rigin B.V. Crossing of different chromosome groups of wheat and *Triticale* to rye. *Collection of Papers of Postgraduates and Young Scientists*. Leningrad, 1965;6(10)27-35. (in Russian)]
- Ригин Б.В. Скрещиваемость пшеницы с рожью. *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 1976;58(1):12-34. [Rigin B.V. Crossability of wheat with rye. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1976;58(1):12-34. (in Russian)]
- Суриков И.М., Киссель Н.И. Наследование хорошей скрещиваемости озимой пшеницы с рожью. *Цитология и генетика*. 1980;14(4):71-73. [Surikov I.M., Kissel N.I. Inheritance of good winter wheat-rye crossability. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 1980;14(4):71-73. (in Russian)]
- Суриков И.М., Киссель Н.И. Скрещиваемость мягкой пшеницы с диплоидной и тетраплоидной рожью. *Цитология и генетика*. 1985;19(1):40-43. [Surikov I.M., Kissel N.I. Crossability of bread wheat with diploid and tetraploid rye. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 1985;19(1):40-43. (in Russian)]
- Суриков И.М., Киссель Н.И. Скрещиваемость культурного ячменя с мягкой пшеницей. *Цитология и генетика*. 1987;21(3):221-225. [Surikov I.M., Kissel N.I. Crossability of *Hordeum vulgare* with *Triticum aestivum*. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 1987;21(3):221-225. (in Russian)]
- Хакимова А.Г., Губарева Н.К., Кошкин В.А., Митрофанова О.П. Генетическое разнообразие и селекционная ценность синтетической гексаплоидной пшеницы, привлеченной в коллекцию ВИР. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(6):738-745. [Khakimova A.G., Gubareva N.K., Koshkin V.A., Mitrofanova O.P. Genetic diversity and breeding value of synthetic hexaploid wheat introduced into the VIR collection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):738-745. DOI 10.18699/VJ19.548. (in Russian)]
- Alfares W. Analyses génétiques et moléculaires du locus *SKr* impliqué dans l'aptitude du blé (*Triticum aestivum* L.) au croisement avec le seigle (*Secale cereale* L.). 2009. Available at: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00724743>. (in French).
- Alfares W., Bouguennec A., Balfourier F., Gay G., Bergès H., Vautrin S., Sourdille P., Bernard M., Feuillet C. Fine mapping and marker development for the crossability gene *SKr* on chromosome 5BS of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*. 2009;183(2):469-481. DOI 10.1534/genetics.109.107706.
- Backhouse W.O. Note on the inheritance of "crossability". *J. Genet.* 1916;6(2):91-94.
- Bertin I., Fish L., Foote T.N., Knight E., Snape J., Moore G. Development of consistently crossable wheat genotypes for alien wheat gene transfer through fine-mapping of the *Kr1* locus. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(8):1371-1381. DOI 10.1007/s00122-009-1141-z.
- Bouguennec A., Lesage V.S., Gateau I., Sourdille P., Jahier J., Lonnet P. Transfer of recessive *skr* crossability trait into well-adapted French wheat cultivar Barok through marker-assisted backcrossing method. *Cereal Res. Comm.* 2018;46(4):604-615. DOI 10.1556/0806.46.2018.043.
- Cadalen T., Boeuf C., Bernard S., Bernard M. An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. Em. Thell. and comparison with a map from a wide cross. *Theor. Appl. Genet.* 1997;94(3-4):367-377. DOI 10.1007/s001220050425.
- Cai H., Liu Q. Characterizing the sequences of *Kr* gene in common wheat. *Triticeae Genomics Genetics*. 2012;3(4):38-43. DOI 10.5376/tgg.2012.03.0004.
- Cai H., Zhao W., Xu Z., Jiang W., Yao Y., Zhao Y. the differences of molecular structure of dominant *Kr1* and recessive *kr1* gene in common wheat. *J. Nucl. Agric. Sci.* 2016;30(5):841-849. (in Chinese)
- Cakmak I., Derici R., Torun B., Tolay I., Brau H.J., Schlegel R. Role of rye chromosomes in improvement of zinc efficiency in wheat and triticale. *Plant Soil.* 1997;196:249-253. DOI 10.1023/A:1004210309876.
- Chantret N., Cenci A., Sabot F., Anderson O., Dubcovsky J. Sequencing of the *Triticum monococcum* hardness locus reveals good microcolinearity with rice. *Mol. Genet. Genomics*. 2004;271(4):377-386. DOI 10.1007/s00438-004-0991-y.
- Crespo-Herrera L.A., Garkava-Gustavsson L., Åhman I. A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Hereditas*. 2017;154(14):1-9. DOI 10.1186/s41065-017-0033-5.
- Ehdaie B., Whitkus R.W., Waines J.G. Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. *Crop Sci.* 2003;43(2):710-717. DOI 10.2135/cropsci2003.7100.
- Falk D., Kasha K.J. Comparison of the crossability of rye (*Secale cereale*) and *Hordeum bulbosum* onto wheat (*Triticum aestivum*). *Can. J. Genet. Cytol.* 1981;23(1):81-88. DOI 10.1139/g81-010.
- Falk D., Kasha K.J. Genetic studies of the crossability of hexaploid wheat with rye and *Hordeum bulbosum*. *Theor. Appl. Genet.* 1983;64(4):303-307. DOI 10.1007/BF00274168.
- Fedak G., Jui P.Y. Chromosomes of Chinese Spring wheat carrying genes for crossability with Betzes barley. *Can. J. Genet. Cytol.* 1982;24(2):227-233. DOI 10.1139/g82-024.
- Fu Y.B., Somers D.J. Genome-wide reduction of genetic diversity in wheat breeding. *Crop Sci.* 2009;49(1):161-168. DOI 10.2135/cropsci2008.03.0125.
- Gay G., Bernard M. Production of intervarietal substitution lines with improved interspecific crossability in the wheat cv Courtot. *Agro-nomie*. 1994;14(1):27-32. DOI 10.1051/agro:19940103.
- Hao C., Wang L., Zhang X., You G., Dong Y., Jia J., Liu X., Shang X., Liu S., Cao Y. Genetic diversity in Chinese modern wheat varieties revealed by microsatellite markers. *Sci. China Ser. C*. 2006;49(3):218-226. DOI 10.1007/s11427-006-0218-z.
- Hiebert C.W., Thomas J.B., Somers D.J., McCallum B.D., Fox S.L. Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(6):877-884. DOI 10.1007/s00122-007-0604-3.
- Jalani B.S., Moss J.P. The site of action of crossability genes (*Kr1*, *Kr2*) between *Triticum* and *Secale*. II. Proportion of pistils containing pollen tubes and effects of alternate pollination on seed set. *Euphytica*. 1981;30(1):105-112. DOI 10.1007/BF00033665.
- Kahiluoto H., Kaseva J., Balek J., Olesen J.E., Ruiz-Ramos M., Gobin A., Kersebaum K.C., Takáč J., Ruget F., Ferrise R., Bezak P., Capellades G., Dibari C., Mäkinen H., Nendel C., Ventrella D., Rodríguez A., Bindi M., Trnka M. Decline in climate resilience of European wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019;116(1):123-128. DOI 10.1073/pnas.1804387115.
- Kearsey M.J., Hyne V. QTL analysis: a simple 'marker-regression' approach. *Theor. Appl. Genet.* 1994;89(6):698-702. DOI 10.1007/BF00223708.
- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2014;4(3):236-244. DOI 10.1134/S2079059714030022.
- Koba T., Shimada T. Crossability of common wheat [*Triticum aestivum*] with *Aegilops squarrosa*. *Wheat Inf. Serv.* 1993;77:7-12.
- Krolow K.D. Untersuchungen fiber die Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Z. Pflanzenzüchtg.* 1970;64:44-72. (in German)

- Lamoureux D., Boeuf C., Regad F., Garsmeur O., Charmet G., Sourdille P., Lagoda P., Bernard M. Comparative mapping of the wheat 5B short chromosome arm distal region with rice, relative to a crossability locus. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(5):759-765. DOI 10.1007/s00122-002-0916-2.
- Lange W., Riley R. The position on chromosome 5B of wheat of the locus determining crossability with rye. *Genet. Res.* 1973;22(2):143-153. DOI 10.1017/S0016672300012933.
- Lange W., Wojciechowska B. The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica.* 1976;25(1):609-620. DOI 10.1007/BF00041598.
- Lange W., Wojciechowska B. The crossing of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.). II. Fertilization and early post-fertilization developments. *Euphytica.* 1977; 26(2):287-297. DOI 10.1007/BF00026990.
- Lein A. Die genetische Grundlage der Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. *Mol. General Genet. MGG.* 1943;81(1):28-61. DOI 10.1007/BF01847441. (in German)
- Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression and gene pyramiding. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2013;3(6):464-473. DOI 10.1134/S2079059713060051.
- Li Z., Ren Z., Tan F., Tang Z., Fu S., Yan B., Ren T. Molecular cytogenetic characterization of new wheat-rye 1R(1B) substitution and translocation lines from a Chinese *Secale cereale* L. Aigen with resistance to stripe rust. *PLoS One.* 2016;11(9):1-6. DOI 10.1371/journal.pone.0163642.
- Liu K.D., Wang J., Li H.B., Xu C.G., Liu A.M., Li X.H., Zhang Q. A genome-wide analysis of wide compatibility in rice and the precise location of the *S5* locus in the molecular map. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95(5-6):809-814. DOI 10.1007/s001220050629.
- Lorieux M., Ndjiondjop M.N., Ghesquière A. A first interspecific *Oryza sativa* × *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 2000;100(3-4):593-601. DOI 10.1007/s001229900061.
- Mago R., Miah H., Lawrence G.J., Wellings C.R., Spielmeier W., Bariana H.S., McIntosh R.A., Pryor A.J., Ellis J.G. High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. *Theor. Appl. Genet.* 2005;112(1):41-50. DOI 10.1007/s00122-005-0098-9.
- Manickavelu A., Koba T., Mishina K., Sassa H. Identification of differential gene expression for *Kr1* gene in bread wheat using annealing control primer system. *Mol. Biol. Rep.* 2009a;36(8):2111-2118. DOI 10.1007/s11033-008-9423-0.
- Manickavelu A., Koba T., Mishina K., Sassa H. Molecular characterization of crossability gene *Kr1* for intergeneric hybridization in *Triticum aestivum* (Poaceae: Triticeae). *Plant Syst. Evol.* 2009b; 278(1-2):125-131. DOI 10.1007/s00606-008-0139-3.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers J.W., Morris C.F., Appels R., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat. *KOMUGI Integrated Wheat Science Database.* 2014. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
- Mishina K., Sato H., Manickavelu A., Sassa H., Koba T. Molecular mapping of *SKr* for crossability in common wheat. *Breed Sci.* 2009; 59(5):679-684. DOI 10.1270/jsbbs.59.679.
- Molnár-Láng M. The crossability of wheat with rye and other related species. In: Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. (Eds.). *Alien Introgression in Wheat: Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics.* Chem: Springer Int. Publ., 2015;103-120. DOI 10.1007/978-3-319-23494-6_4.
- Molnár-Láng M., Cseh A., Szakács É., Molnár I. Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles *kr1kr1kr2kr2* and the 1BL.1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. *Theor. Appl. Genet.* 2010; 120(8):1535-1545. DOI 10.1007/s00122-010-1274-0.
- Nelson J.C., Sorrells M.E., Van Deynze A.E., Lu Y.H., Atkinson M., Bernard M., Leroy P., Faris J.D., Anderson J.A. Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. *Genetics.* 1995;141(2):721-731.
- Owuocuo J.O., Briggs K.G., Taylor G.J. The efficiency of copper use by 5A/5RL wheat-rye translocation lines and wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Soil.* 1996;180(1):113-120. DOI 10.1007/BF00015417.
- Pershina L.A. Plant chromosome engineering is an area of biotechnology. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2014;4(4):311-317. DOI 10.1134/S207905971404008X.
- Pershina L.A., Trubacheeva N.V. Interspecific incompatibility in the wide hybridization of plants and ways to overcome it. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(4):358-368. DOI 10.1134/S2079059717040098.
- Porceddu E., Ceoloni C., Lafiandra D., Tanzarella O.A., Scarascia Mugnozza G.T. Genetic resources and plant breeding: problems and prospects. In: Miller T.E., Koebner R.M.D. (Eds.). *Proc. 7th. Int. Wheat Genetics Symp., 13-19 July.* Cambridge, UK, Institute of Plant Science Research. Cambridge, 1988;1:17-21.
- Porter D.R., Webster J.A., Burton R.L., Puterka G.J., Smith E.L. New sources of resistance to greenbug in wheat. *Crop Sci.* 1991;31(6): 1502-1504. DOI 10.2135/cropsci1991.0011183X003100060021x.
- Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 2000;84(2):203. DOI 10.1094/PDIS.2000.84.2.203B.
- Pyykkönen V.P., Pendinen G.I., Mitrofanova O.P. The characteristics of primary hybrids obtained in crosses between common wheat from China and cultivated rye. *Russ. J. Genet.* 2019;55(11):1306-1314. DOI 10.1134/S1022795419110115.
- Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. *Euphytica.* 1998;100(1-3): 323-340. DOI 10.1023/A:1018361819215.
- Ren T.H., Chen F., Yan B.J., Zhang H.Q., Ren Z.L. Genetic diversity of wheat-rye 1BL.1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources. *Euphytica.* 2012;183(2):133-146. DOI 10.1007/s10681-011-0412-3.
- Ren T., Tang Z., Fu S., Yan B., Tan F., Ren Z., Li Z. Molecular cytogenetic characterization of novel wheat-rye 1T1RS.1BL translocation lines with high resistance to diseases and great agronomic traits. *Front. Plant Sci.* 2017;8:799. DOI 10.3389/fpls.2017.00799.
- Ren T.H., Yang Z.J., Yan B.J., Zhang H.Q., Fu S.L., Ren Z.L. Development and characterization of a new 1BL.1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat. *Euphytica.* 2009;169(2):207-213. DOI 10.1007/s10681-009-9924-5.
- Riley R., Chapman V. The inheritance in wheat of crossability with rye. *Genet. Res.* 1967;9(3):259-267. DOI 10.1017/S0016672300010569.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998; 149(4):2007-2023.
- Roussel V., Koenig J., Beckert M., Balfourier F. Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108(5):920-930. DOI 10.1007/s00122-003-1502-y.
- Rui M., Zheng D.S., Fan L. The crossability percentages of 96 bread wheat landraces and cultivars from Japan with rye. *Euphytica.* 1995; 92(3):301-306. DOI 10.1007/BF00037112.
- Schlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2019. Available at: <http://www.rye-gene-map.de/rye-introgression/index.html>.
- Sears E.R., Loegering W.Q., Rodenhiser H.A. Identification of chromosomes carrying genes for stem rust resistance in four varieties of wheat. *Agron. J.* 1957;49(4):208-212. DOI 10.2134/agronj1957.00021962004900040012x.
- Singh S., Sethi G.S. Crossability of some bread wheat landraces and improved cultivars from western Himalayas with rye. *Euphytica.* 1991;53(2):137-141. DOI 10.1007/BF00023794.
- Sitch L.A., Snape J.W., Firman S.J. Intrachromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.* 1985;70(3):309-314. DOI 10.1007/BF00304917.

- Snape J.W., Chapman V., Moss J., Blanchard C.E., Miller T.E. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. *Heredity*. 1979;42(3):291-298. DOI 10.1038/hdy.1979.32.
- Snape J., Zhang W., Wang Y., Moore G., Foote T., Dunford R., Zheng Y. Mapping of genes controlling crossability and homoeologous chromosome pairing on chromosome 5B using molecular markers. *Ann. Wheat Newsllett*. 1995;41:205-206.
- Somers D.J., Isaac P., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(6):1105-1114. DOI 10.1007/s00122-004-1740-7.
- Stein J.C., Howlett B., Boyes D.C., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88(19):8816-8820. DOI 10.1073/pnas.88.19.8816.
- Stein N., Prasad M., Scholz U., Thiel T., Zhang H., Wolf M., Kota R., Varshney R.K., Perovic D., Grosse I., Graner A. A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114(5):823-839. DOI 10.1007/s00122-006-0480-2.
- Szakács É., Szőke-Pázi K., Kalapos B., Schneider A., Ivanizs L., Rakszegi M., Vida G., Molnár I., Molnár-Láng M. 1RS arm of *Secale cereale* 'Kriszta' confers resistance to stripe rust, improved yield components and high arabinoxylan content in wheat. *Sci. Rep.* 2020;10:1792. DOI 10.1038/s41598-020-58419-3.
- Tang Z.X., Fu S.L., Ren Z.L., Zhang H.Q., Yang Z.J., Yan B.J. Characterization of three wheat cultivars possessing new 1BL.1RS wheat-rye translocations. *Plant Breed.* 2009;128(5):524-527. DOI 10.1111/j.1439-0523.2008.01598.x.
- Timonova E.M., Dobrovol'skaya O.B., Sergeeva E.M., Bildanova L.L., Sourdille P., Feuillet C., Salina E.A. A comparative genetic and cytogenetic mapping of wheat chromosome 5B using introgression lines. *Russ. J. Genet.* 2013;49(12):1200-1206. DOI 10.1134/S1022795413120132.
- Tixier M.H., Sourdille P., Charmet G., Gay G., Jaby C., Cadalen T., Bernard S., Nicolas P., Bernard M. Detection of QTLs for crossability in wheat using a doubled-haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97(7):1076-1082. DOI 10.1007/s001220050994.
- Wang J., Liu K.D., Xu C.G., Li X.H., Zhang Q. The high level of wide-compatibility of variety 'Dular' has a complex genetic basis. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97(3):407-412. DOI 10.1007/s001220050910.
- Xie D.X., Devos K.M., Moore G., Gale M.D. RFLP-based genetic maps of the homoeologous group 5 chromosomes of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1993;87(1):70-74. DOI 10.1007/BF00223747.
- Yang M.Y., Ren T.H., Yan B.J., Li Z., Ren Z.L. Diversity resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in rye chromosome arm 1RS expressed in wheat. *Genet. Mol. Res.* 2014;13(4):8783-8793. DOI 10.4238/2014.October.27.20.
- Zeven A.C. Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. *Euphytica*. 1987;36(1):299-319. DOI 10.1007/BF00730677.
- Zeven A.C., Van Heemert C. Germination of pollen of weed rye (*Secale segetale* L.) on wheat (*Triticum aestivum* L.) stigmas and the growth of the pollen tubes. *Euphytica*. 1970;19(2):175-179. DOI 10.1007/BF01902941.
- Zhang L., Wang J., Zhou R., Jia J. Discovery of quantitative trait loci for crossability from a synthetic wheat genotype. *J. Genet. Genomics*. 2011;38(8):373-378. DOI 10.1016/j.jgg.2011.07.002.
- Zheng Y.L., Luo M.C., Yen C., Yang J.L. Chromosome location of a new crossability gene in common wheat. *Wheat Inf. Serv. (Japan)*. 1992;75:36-40.
- Zheng-Song P., Deng-Cai L., Chi Y., Jun-Liang Y. Crossability of tetraploid wheat landraces native to Sichuan, Shaanxi, Gansu and Xinjiang provinces, China with rye. *Genet. Resour. Crop Evol.* 1998;45(1):57-62. DOI 10.1023/A:1008669429068.

ORCID ID

I.V. Porotnikov orcid.org/0000-0001-5841-8803
O.Yu. Antonova orcid.org/0000-0001-8334-8069

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.02.2020. После доработки 11.08.2020. Принята к публикации 11.08.2020.

Изучение генетических факторов, определяющих признак «тетраостость» мягкой пшеницы

О.Б. Добровольская^{1, 2}✉, А.Е. Дресвянникова¹, Е.Д. Бадаева³, К.И. Попова⁴, М. Травничкова⁵, П. Мартинек⁶

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

² Российский университет дружбы народов (РУДН), Аграрно-технологический институт, Москва, Россия

³ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт растениеводства, Прага, Чешская Республика

⁶ Agrotest Fyto Ltd., Kroměříž, Czech Republic

✉ e-mail: oxanad@bionet.nsc.ru

Аннотация. Ости – тонкие заостренные отростки, сформированные в дистальной части чешуй колоска соцветия некоторых видов злаков, включая такие экономически значимые культуры, как пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.) и твердая (*T. durum* Desf.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.), рис (*Oryza sativa* L.), рожь (*Secale cereale* L.). Наличие длинных остей на колосковых чешуях характерно для одного вида пшеницы – *T. carthlicum* Nevski, киль колосковой чешуи которого переходит в длинный остевидный отросток или ость, равную по длине ости цветковой чешуи. Колос *T. carthlicum* имеет удвоенное число остей, а сам признак получил название «тетраостость» или персиоидность. Ости на месте килевого зубца колосковых чешуй могут формироваться у пшениц *T. aestivum* и *T. aethiopicum*, однако такие формы встречаются редко. Особенности развития признака тетраостости и его генетические детерминанты изучены мало. В настоящем исследовании рассмотрены особенности развития и наследования признака «тетраостость» линии CD 1167-8 мягкой пшеницы *T. aestivum* с применением классического генетического анализа, молекулярно-генетического картирования и сканирующей электронной микроскопии. Показано, что признак наследуется как рецессивный моногенный. Ген, контролирующий тетраостость линии CD 1167-8, картирован в длинном плече хромосомы 5A с использованием 15K-SNP-микрочипа, содержащего 15 000 ассоциированных с генами SNP пшеницы (Illumina Infinium 15K Wheat Array, TraitGenetics GmbH). Результаты теста на аллелизм продемонстрировали, что изучаемый ген аллелен *b1*, рецессивному аллелю гена-ингибитора остистости *B1* (5AL). Таким образом, ген, контролирующий формирование остей на колосковых чешуях мягкой пшеницы, является рецессивным аллелем гена ингибитора остистости *B1*. Новый аллель обозначен *b1.ag* (*b1. awned glume*). Анализ развивающегося соцветия линии CD 1167-8 с помощью сканирующей электронной микроскопии выявил, что зачатки остей колосковых чешуй формируются по мере развития и роста колосковых чешуй одновременно с развитием остей на цветковых чешуях, различий в развитии остей на цветковых и колосковых чешуях не обнаружено.

Ключевые слова: пшеница; *Triticum aestivum* L.; колос; остистость; тетраостость; молекулярно-генетическое картирование; SEM; ингибитор остистости *B1*.

Для цитирования: Добровольская О.Б., Дресвянникова А.Е., Бадаева Е.Д., Попова К.И., Травничкова М., Мартинек П. Изучение генетических факторов, определяющих признак «тетраостость» мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):568-574. DOI 10.18699/VJ20.650

The study of genetic factors that determine the awned glume trait in bread wheat

O.B. Dobrovolskaya^{1, 2}✉, A.E. Dresvyannikova¹, E.D. Badaeva³, K.I. Popova⁴, M. Trávníčková⁵, P. Martinek⁶

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

² RUDN University, Agrarian and Technological Institute, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia

⁵ Crop Research Institute, Prague, Czech Republic

⁶ Agrotest Fyto, Ltd., Kroměříž, Czech Republic

✉ e-mail: oxanad@bionet.nsc.ru

Abstract. Awns are bristle-like structures, typically extending from the tip end of the lemmas in the florets of cereal species, including such economically important crops as wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.), barley (*Hordeum vulgare* L.), rice (*Oryza sativa* L.), and rye (*Secale cereale* L.). The presence of long awns adhered at tip end of glumes is a characteristic feature of "Persian wheat" *T. carthlicum* Nevski spike. Glume outgrowth of *T. carthlicum* Nevski spike passes into a long awn, equal in length to the lemma awn. Awned glumes can be formed in *T. aestivum* and *T. aethiopicum* wheats, however, such forms are rare. Features of the awned glume development and the genetic determinants

of this trait have been little studied. In this paper, we described the features of the development and inheritance of the tetra-awnness (awned glume) trait of the bread wheat *T. aestivum* line CD 1167-8, using classical genetic analysis, molecular genetic mapping, and scanning electron microscopy. It was shown that the trait is inherited as a recessive monogenic. The gene for the awned glume trait of CD 1167-8 was mapped in the long arm of chromosome 5A, using the Illumina Infinium 15K Wheat Array (TraitGenetics GmbH), containing 15,000 SNPs associated with wheat genes. Results of allelism test and molecular-genetic mapping suggest that the gene for awned glumes in bread wheat is a recessive allele of the *B1* awn suppressor. This new allele was designated the *b1.ag* (*b1. awned glume*). Analysis of the CD 1167-8 inflorescence development, using scanning electron microscopy, showed that awns had grown from the top of the lemmas and glumes simultaneously, and no differences in patterns of their development were found.

Key words: wheat; *Triticum aestivum* L.; spike; awnedness; awned glume; molecular-genetic mapping; SEM; *B1* awn suppressor.

For citation: Dobrovolskaya O.B., Dresvyannikova A.E., Badaeva E.D., Popova K.I., Trávníčková M., Martinek P. The study of genetic factors that determine the awned glume trait in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):568-574. DOI 10.18699/VJ20.650 (in Russian)

Введение

Ости представляют собой тонкие заостренные отростки, сформированные в дистальной части чешуй соцветий некоторых видов злаков, в том числе экономически значимых сельскохозяйственных культур – пшеницы (*Triticum aestivum*, *T. durum*), ячменя (*Hordeum vulgare*), риса (*Oryza sativa*) и ржи (*Secale cereale*).

У дикорастущих злаков основная функция остей – распространение плодов (зерновок). Кроме того, они выполняют защитную роль и препятствуют поеданию плодов животными и птицами. В процессе доместикации эти функции утратили свое значение. Доместикация сопровождалась редукцией органов, способствующих распространению семян – остей, волосков, щетинок (Fuller, Allaby, 2018). У многих культивируемых сортов пшеницы и ячменя ости сохранились, однако, по сравнению с дикорастущими предками, стали короче, тоньше и легче (Peleg et al., 2010; Naas et al., 2019). Ости пшеницы, ячменя и ржи содержат хлорофилл и являются фотосинтезирующими органами. Показано, что доля вклада остей в фотосинтезе колоса ячменя составляет 70–90 %. При этом 30 % всех сухих веществ зерна, в том числе 50 % крахмала, создается остями (Ионова, 2005). Наличие остей может способствовать увеличению урожайности в определенных климатических условиях (засушливость, повышенные температуры). Остистые формы преобладают среди сортов пшениц Австралии, Южной и Центральной Америки, США (Rebetzke et al., 2016). В условиях Северной и Центральной Европы остистость не обеспечивает адаптивные преимущества и среди сортов пшеницы преобладают безостые формы (Börner et al., 2005; Rebetzke et al., 2016).

Наружная цветковая чешуя у мягкой пшеницы несет ость или острый зубец (изредка вершина тупая, без зубца), на колосковых чешуях этого вида могут встречаться острые длинные (до 5 см) килевые зубцы (Дорофеев и др., 1979). У тетраплоидной пшеницы *T. carthlicum* Nevski (классификация В.Ф. Дорофеева (1979), синоним «Персидская пшеница» *T. persicum* Vav. – наименование вида, данное Н.И. Вавиловым) киль колосковой чешуи переходит в длинный остевидный отросток или ость длиной до 12 см. Длина ости колосковой чешуи равна длине цветковой чешуи, и весь колос имеет удвоенное число остей. Наличие длинных остей на колосковых чешуях *T. carthlicum* – одна из основных характерных черт этого

вида. Ости вместо килевого зубца колосковых чешуй могут формироваться у некоторых рас *T. aestivum*, однако у других видов пшениц встречаются крайне редко (Вавилов, Якушкина, 1925). В.Ф. Дорофеев с коллегами (1979) отмечали наличие тетраостых колосков у *T. aethiopicum*.

У мягкой пшеницы безостость доминирует над остистостью (Гончаров, 2012). Известны три доминантных неаллельных гена, ингибирующих развитие остей пшеницы, *B1*, *B2* и *Hd*, локализованные в хромосомах 5AL, 6BL и 4BS соответственно (Watkins, Ellerton, 1940; Sears, 1954, 1966; Kato et al., 1998; Sourdille et al., 2002; Yoshioka et al., 2017; Huang et al., 2020). Наиболее распространен аллель *B1*, он ингибирует развитие остей у гексаплоидных и тетраплоидных пшениц (Гончаров, 2002; Le Couvieur et al., 2011; Mackay et al., 2014; Yoshioka et al., 2017). Для всех трех генов определена локализация в хромосомах с помощью молекулярно-генетического картирования (Yoshioka et al., 2017). Недавно D. Huang с коллегами (2020) показали, что ген *B1* кодирует транскрипционный фактор с мотивом «цинковые пальцы» C2H2-типа. Анализ гаплотипов *B1* показал, что доминантный аллель этого гена – наиболее распространенный ингибитор остей у пшеницы (Huang et al., 2020).

Признак «тетраостость» пшеницы изучен в меньшей степени. Н.И. Вавилов и О.В. Якушкина (1925) исследовали характер наследования ряда признаков, характерных для «Персидской пшеницы» *T. carthlicum*, среди которых был признак «длина остевидных придатков колосковых чешуй». Они провели масштабный гибридологический анализ, скрещивая *T. carthlicum* с различными видами ди-, тетра- и гексаплоидных пшениц, а также эгилопсами и рожью (всего 64 комбинации скрещиваний), и изучили закономерности наследования признаков. Была отмечена сложная генетическая природа признака, показано, что он контролируется несколькими генами. В других работах был обнаружен рецессивный характер наследования признака тетраостости у *T. carthlicum* (Мигушова, Жуковский, 1969). По данным П.А. Гандиляна (1973), наличие тетраостости (персикоидности) связано со специфическим геном *T. P.V.* Рожков с коллегами (2014) показали, что признак «тетраостость» *T. carthlicum* и *T. petropavlovskiy* при скрещивании с сортами твердой (*T. durum*) и мягкой (*T. aestivum*) пшениц соответственно, наследуется как рецессивный. При этом, если при скрещивании *T. petropavlovskiy* с мягкой пшеницей за формирование тетраостости

отвечает один ген, то в комбинациях с *T. persicum* влияние оказывают несколько генов.

Настоящее исследование посвящено изучению генетического контроля и особенностей формирования признака «тетраостость» мягкой пшеницы. С использованием молекулярно-генетического картирования была определена локализация главного гена, контролирующего тетраостый фенотип, в хромосоме 5AL мягкой пшеницы. Локализация гена и результаты теста на аллелизм предполагают, что этот ген является рецессивным аллелем ингибитора остистости *В1*.

Материалы и методы

Растительный материал. Исследовали линию мягкой пшеницы *T. aestivum* CD 1167-8 с тетраостым фенотипом, полученную д-ром П. Мартинекком (Агротест Фито Лтд., Кромержиж, Чешская Республика).

Изучение особенностей наследования признака «тетраостость» проводили на гибридах F_1 , F_2 и F_3 от скрещивания CD 1167-8 и безостой линии мягкой пшеницы сорта Новосибирская 67 (Н67) и последующих самоопылений. Линия CD 1167-8 использована в скрещиваниях и как материнское, и как отцовское растение.

Тест на аллелизм проведен при скрещивании CD 1167-8 с остистой линией мягкой пшеницы Rus 204, полученной д-ром П. Мартинекком. Эта линия была ранее детально охарактеризована с применением методов молекулярной генетики и цитогенетики (Добровольская, 2018). Все используемые в работе линии мягкой пшеницы имеют яровой тип развития.

Растения выращивали в полевых условиях на базе селекционно-генетического комплекса Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, 2015–2016 гг.), а также в полевых условиях в г. Кромержиж (Чешская Республика, 2016 г.). Оценку фенотипов колоса (наличие/отсутствие остей колосковых и цветковых чешуй) проводили после полного созревания растений. Соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому в популяциях гибридов оценивали по критерию χ^2 (Рокицкий, 1973).

Молекулярно-генетическое картирование. Образцы суммарной ДНК выделяли из листьев 90 индивидуальных растений популяции F_2 CD 1167-8 \times Н67 (далее – картирующей популяции) и родительских линий CD 1167-8 и Н67, согласно методу J. Plaschke с коллегами (1995).

Генотипирование растений картирующей популяции выполняли с использованием 15K-SNP-микрочипа, содержащего 15000 SNP, ассоциированных с генами пшеницы (Illumina Infinium 15K Wheat Array, TraitGenetics GmbH, Гатерслебен, Германия). Анализ полученных данных, построение молекулярно-генетической карты осуществляли при помощи программы MultiPoint версии UltraDense (Ronin et al., 2010, 2015), как описано ранее (Dresvyannikova et al., 2019). Графическое изображение молекулярно-генетической карты выполнено с помощью программы MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

Сканирующая электронная микроскопия. Развивающиеся соцветия линии CD 1167-8 вычленили из вторичных побегов растений с использованием бинокулярного микроскопа Альтами PC0745 («Альтами», Санкт-Пе-

тербург, Россия). Особенности строения соцветия изучали при помощи сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM-1000 (Hitachi, Ltd., Япония) при постоянном ускоряющем напряжении 15 кВ и степени разрядки в камере для образца 30–50 Па. Растительный материал для сканирующей электронной микроскопии не подвергали предварительной обработке. Для получения и обработки изображений использовали программное обеспечение для Hitachi TM-1000.

Изучение кариотипа. Кариотип тетраостой линии CD 1167-8 изучен с применением С-дифференциального окрашивания, проведенном по ранее опубликованной методике (Badaeva et al., 1994). Препараты анализировали при помощи микроскопа Leitz Wetzlar (Leica microsystems, Германия). Для получения изображений использовали цифровую камеру CCD Leica DFC 280 (Leica microsystems). Хромосомы классифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Gill et al., 1991).

Результаты и обсуждение

Линия мягкой пшеницы CD 1167-8 характеризуется наличием остей как на цветковых, так и на колосковых чешуях (рис. 1, а, б). Ости колосковых чешуй этой линии (2.5 ± 0.1 см) короче и тоньше остей цветковых чешуй. Признак проявлялся при выращивании растений линии в полевых условиях г. Новосибирска (2015–2016 гг.) и г. Кромержижа Чешской Республики (2016 г.), а также в условиях тепличного комплекса ИЦиГ СО РАН (2009–2017 гг.). Признак стабильно наследовался при самоопылении линии. Таким образом, наличие тетраостости изучаемой линии стабильно наследуется и проявляется в различных условиях выращивания.

Изучение ранних этапов развития соцветия линии CD 1167-8 мягкой пшеницы с использованием сканирующей электронной микроскопии показало, что зачатки остей колосковых чешуй формируются по мере развития и роста колосковых чешуй одновременно с развитием остей на цветковых чешуях (рис. 2). Особенности, отличающие развитие остей колосковых чешуй от развития остей цветковых чешуй, не обнаружено.

Для выявления генетических детерминант тетраостости мягкой пшеницы были получены популяции гибридов от скрещиваний CD 1167-8 и безостой линии пшеницы Новосибирская 67 (Н67), в которых растение тетраостой линии CD 1167-8 использовано и как материнское (CD1167-8 \times Н67), и как отцовское (Н67 \times CD1167-8). Гибриды F_1 были безостыми, а в поколении гибридов F_2 наблюдали расщепление на безостые и остистые (тетраостые) формы с преобладанием безостых. Все остистые растения F_2 были тетраостыми.

Из 117 растений гибридов F_2 от скрещивания Н67 \times CD 1167-8 34 были остистыми, а остальные 83 – безостыми, что соответствует моногенному рецессивному типу наследования признака «тетраостость» ($\chi^2 = 1.028$, $p = 0.05$). Аналогичные результаты получены и в скрещивании CD 1167-8 \times Н67 – соотношение остистых растений (41) к безостым (119) соответствует 1 : 3 ($\chi^2 = 0.033$, $p = 0.05$), что означает моногенное рецессивное наследование признака. Различий в реципрокных скрещиваниях не обнаружено.



Рис. 1. Тетраостый колос линии мягкой пшеницы CD 1167-8.

Ости нижней цветковой (нцч) и колосковой (кч) чешуй обозначены серой и черной стрелками соответственно; з – зерновка; вцч – верхняя цветковая чешуя.

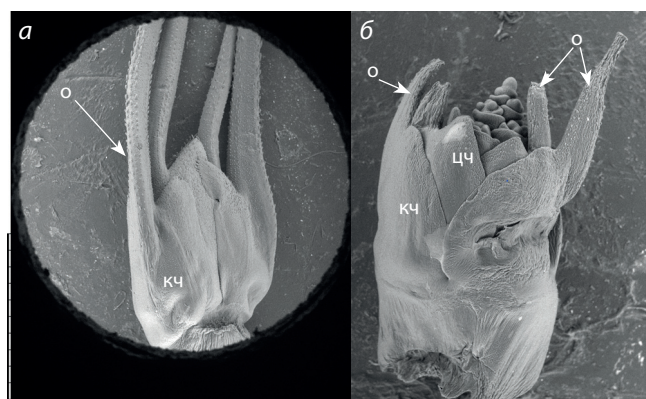


Рис. 2. СЭМ-анализ строения колоска развивающегося соцветия мягкой пшеницы у линии CD 1167-8.

а – ости (о) на колосковых чешуях (кч) колоска, масштаб 2 мм; б – начальная стадия роста зачатков остей колосковой и цветковой чешуи (цч), масштаб 1 мм.

При изучении наследования ряда характерных для «Персидской пшеницы» признаков Н.И. Вавилов и О.В. Якушкина (1925) отмечали, что развитие остевидных придатков на колосковых чешуях – хорошо наследуемый, мало зависящий от внешних условий признак. Обобщая результаты 62 комбинаций скрещиваний с различными видами пшениц, они сделали вывод о полимерном наследовании признака. Вместе с тем отмечено, что при скрещивании с безостыми формами безостость доминирует и в поколении гибридов F_2 выщепляются остистые формы, составляющие 1/4 часть от всех гибридных растений. Остистые формы остаются константными в F_3 (Вавилов, Якушкина, 1925). Рецессивный тип наследования подтвержден и другими учеными (Мигушова, Жуковский, 1969; Рожков и др., 2014). Кроме того, был обнаружен моногенный рецессивный тип наследования признака

при скрещивании гексаплоидных видов пшениц (Рожков и др., 2014).

Результаты генетического анализа показали, что признак тетраостости у мягкой пшеницы также стабильно наследуется и находится под моногенным рецессивным контролем. Обращающей на себя внимание особенностью стало совместное наследование остистости колосковых и цветковых чешуй.

Локализация гена, контролирующего признак «тетраостость» у мягкой пшеницы, была определена с применением молекулярно-генетического картирования на субпопуляции F_2 CD 1167-8 × H67, включающей 90 растений. Из 90 растений картирующей популяции F_2 28 были остистыми (тетраостыми), остальные – безостыми. При самоопылении гибридов F_2 получены 90 семей гибридов F_3 , анализ которых проводили в полевых условиях г. Новосибирска (1127 растений) и г. Кромержижа (954 растения). Анализ гибридов F_3 показал, что 28 семей от самоопыления тетраостых гибридов F_2 проявляли признак «тетраостость», а в семьях от безостых гибридов наблюдалось либо расщепление на остистые и безостые формы (43 семьи), либо потомки были безостыми (19 семей). Расщепление семей F_3 подтверждает моногенный рецессивный характер наследования признака 1 : 2 : 1 ($\chi^2 = 1.97$, $p < 0.05$). Признак «тетраостость» несколько варьировал в своем проявлении, но ни одного растения с парой остей, расположенных исключительно на цветковых или только на колосковых чешуях, не обнаружено.

Для молекулярно-генетического картирования использовали данные высокопроизводительного генотипирования. Всего проанализировано 5160 информативных SNP-локусов. Показано сцепление генетического локуса, контролирующего формирование тетраостого фенотипа, с маркерами хромосомы 5A (рис. 3, см. Приложение)¹. Изучаемый ген расположен дистально по отношению к SNP-маркеру BS00023138-51 (на расстоянии 3 сМ).

Известно, что хромосома пшеницы 5AL несет доминантный ген-ингибитор развития остей – *Bl*. Локализация гена, определяющего тетраостость, и гена *Bl* в дистальном районе хромосомы 5AL совпадает (Yoshioka et al., 2017). На основании этого можно предположить, что тетраостость определяется рецессивным аллелем гена *Bl*, который отличается от рецессивного аллеля, распространенного у сортов мягкой и твердой пшениц и приводящего к развитию пары остей на цветковых чешуях.

Далее был выполнен тест на аллелизм, линия CD 1167-8 с тетраостым колосом была скрещена с линией Rus 204 с типичным для *T. aestivum* остистым колосом (ости развиваются только на цветковых чешуях). Анализ фенотипа гибридов F_1 показал, что все они были остистыми и имели ости как на цветковых, так и на колосковых чешуях. Таким образом, наличие остей на колосковой чешуе доминировало над отсутствием, однако длина остей у гибридов (1.4 ± 0.1 см) была короче, чем у тетраостого родителя (2.5 ± 0.1). Среди гибридов поколения F_2 совершенно безостых растений не обнаружено, все растения (176) имели ости на цветковых чешуях; на колосковой чешуе ости длиной 1–4 см обнаружены у 93 растений, у 83 растений

¹ Приложение см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx8.pdf>

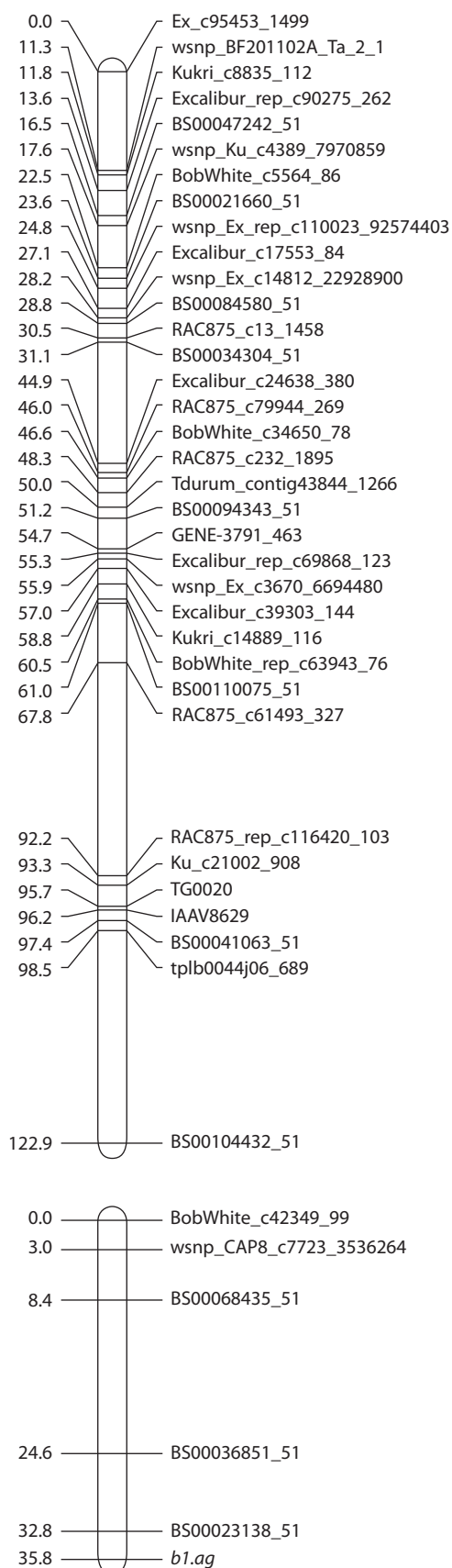


Рис. 3. Молекулярно-генетическая карта хромосомы 5A, содержащая ген *b1.ag*, контролирующей тетраостость мягкой пшеницы.

Слева – расстояния в cM, справа – SNP-маркеры (показаны только скелетные маркеры, представляющие группы косегрегирующих маркеров).

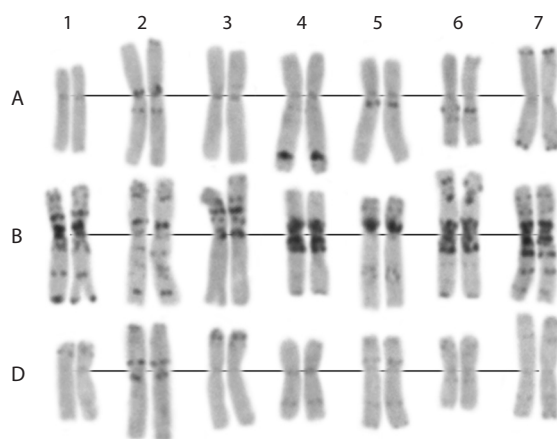


Рис. 4. Кариотип линии CD 1167-8 (С-дифференциальное окрашивание хромосом).

ости на колосковой чешуе не достигали длины 0.5 см, у 4 растений ости на колосковых чешуях полностью отсутствовали, как у линии Rus 204.

Полученные результаты указывают на то, что ген, контролирующий тетраостый фенотип мягкой пшеницы, аллель гену-ингибитору остистости *B1* и является его рецессивным аллелем. Этот аллель мягкой пшеницы описан нами впервые и обозначен как *b1.ag* (*b1. awned glume*).

Выявлено, что отсутствие остей под контролем гена-ингибитора остистости *B1* доминирует над их наличием (*b1* и *b1.ag*), при этом наличие остей на колосковой чешуе под контролем аллеля *b1.ag* доминирует над отсутствием под контролем аллеля *b1*. При этом характер расщепления признака «остистость колосковых чешуй», обнаруженный при скрещивании тетраостой CD 1167-8 и остистой Rus 204 линий пшеницы, более соответствует количественному наследованию признака, следовательно, в контроле изучаемого признака наряду с *b1.ag* принимают участие и другие гены.

Н.И. Вавилов и О.В. Якушкина (1925) показали, что на особенности наследования остистости колосковых чешуй в комбинациях скрещиваний «Персидской пшеницы» с другими видами пшениц могут оказывать влияние не только наличие или отсутствие коротких (до 2 мм) остей у второго родителя, но и форма, ширина и другие особенности колосковых чешуй, что предполагает участие и других генов в контроле изучаемого признака.

Тетраостость не распространена широко среди образцов мягких пшениц. Н.И. Вавилов и О.В. Якушкина (1925) отмечали, что тетраостый фенотип, сходный с фенотипом «Персидской пшеницы», встречается среди туркестанских, персидских и бухарских мягких пшениц. Вместе с тем характерным (систематическим) признаком «тетраостость» является только для одного вида пшеницы – *T. carthlicum*.

Кариотип линии CD 1167-8 изучен с использованием дифференциального С-окрашивания хромосом с целью выявления возможных сегментов интрогрессии от других видов пшеницы. Показано, что линия CD 1167 имеет кариотип, характерный для мягкой пшеницы (см. рис. 4). Вероятно, *b1.ag* – это редкий аллель гена *B1*, встречающийся у мягкой пшеницы.

Заключение

Тетраостость, или развитие остей на колосковых чешуях у мягкой пшеницы, наследуется как рецессивный моногенный признак и находится под контролем гена, локализованного в хромосоме 5AL. Обобщая результаты проведенного нами генетического анализа и молекулярно-генетического картирования, можно предположить, что ген тетраостости мягкой пшеницы является рецессивным аллелем ранее изученного гена-ингибитора остистости *B1*. Этот аллель описан нами впервые и обозначен как *b1.ag* (*b1.awned glume*). Показано, что отсутствие остей под контролем гена-ингибитора остистости *B1* доминирует над их наличием (*b1* и *b1.ag*), при этом наличие остей на колосковой чешуе под контролем аллеля гена *b1.ag* доминирует над отсутствием под контролем аллеля *b1*. Различий в развитии остей на колосковых и цветковых чешуях не обнаружено.

Список литературы / References

- Вавилов Н.И., Якушкина О.В. К филогенезу пшениц. Гибридологический анализ вида *T. persicum* Vav. и межвидовая гибридизация у пшениц. *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 1925;15(1): 3-159.
[Vavilov N.I., Yakushina O.V. On the phylogenesis of wheat. Test cross analysis of *T. persicum* Vav. and interspecific hybridization of wheat. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1925;15(1): 3-159. (in Russian)]
- Гандилян П.А. Колосовые культуры и их дикие сородичи Армянской ССР: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Ереван, 1973.
[Gandilyan P.A. Spike crops and their wild relatives of the Armenian SSR: Doctor Sci. (Biol.) Dissertation. Yerevan, 1973. (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2002.
[Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheats and their Related Species. Novosibirsk: Siberian University Press, 2002. (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Изд. 2-е испр. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012.
[Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheats and their Related Species. Novosibirsk: Geo Publ., 2012. (in Russian)]
- Добровольская О.Б. Молекулярно-генетические основы морфогенеза соцветия пшеницы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2018.
[Dobrovolskaya O.B. Molecular basis of wheat inflorescence morphogenesis: Doctor Sci. (Biol.) Dissertation. Novosibirsk, 2018. (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Э.Ф., Удачин Р.А., Якубцинер М.М. Культурная флора СССР. Т. 1. Пшеница. Л.: Колос, 1979.
[Dorofeev V.F., Filatenko A.A., Migushova E.F., Udachin R.A., Yakubtsiner M.M. The Cultural Flora of the USSR. Vol. 1. Wheat. Leningrad: Kolos Publ., 1979. (in Russian)]
- Ионова Н.Э. Роль отдельных органов в продукционном процессе растений яровой пшеницы разного эколого-географического происхождения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Спб., 2005.
[Ionova N.E. The role of individual organs in the production of spring wheat plants of different ecological and geographical origins: Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. St. Petersburg, 2005. (in Russian)]
- Мигушова Э.Ф., Жуковский П.М. К познанию пшеницы *T. ispahanicum* Heslot. *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 1969;39(3): 71-90.
[Migushova E.F., Zhukovsky P.M. Towards the knowledge of wheat *T. ispahanicum* Heslot. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1969;39(3):71-90. (in Russian)]
- Рожков Р.В., Криворученко Р.В., Коваленко И.В. Генетический контроль тетраостости у пшеницы. *Вестн. Харьковского национального аграрного университета*. 2014;2(32):70-76.
[Rozhkov R.V., Krivoruchenko R.V., Kovalenko I.V. Genetic control of tetrabeardedness in wheat. *Vestnik Khar'kovskogo Natsional'nogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Kharkiv National Agrarian University*. 2014;2(32):70-76. (in Ukrainian)]
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышейш. шк., 1973;77-79.
[Rokitskii P.F. Biological Statistics. Minsk: Vysheishaya Shkola Publ., 1973;77-79. (in Russian)]
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192(1-2):117-145. DOI 10.1007/BF00985912.
- Börner A., Schäfer M., Schmidt A., Grau M., Vorwald J. Associations between geographical origin and morphological characters in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genet. Resour.* 2005;3(3):360-372. DOI 10.1079/PGR200589.
- Dresvyannikova A.E., Watanabe N., Muterko A.F., Krasnikov A.A., Goncharov N.P., Dobrovolskaya O.B. Characterization of a dominant mutation for the liguleless trait: *Aegilops tauschii* liguleless (*Lg^l*). *BMC Plant Biol.* 2019;19(1):55. DOI 10.1186/s12870-019-1635-z.
- Fuller D.Q., Allaby R. Seed dispersal and crop domestication: shattering, germination and seasonality in evolution under cultivation. *Annu. Plant Rev. Online*. 2018;238-295. DOI 10.1002/9781119312994.apr0414.
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*. 1991;34(5):830-839. DOI 10.1139/g91-128.
- Haas M., Schreiber M., Mascher M. Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *J. Integr. Plant Biol.* 2019;61(3):204-225. DOI 10.1111/jipb.12737.
- Huang D., Zheng Q., Melchikart T., Bekkaoui Y., Konkin D.J.F., Kagle S., Martucci M., You F.M., Clarke M., Adamski N.M., Chinoy C., Steed A., McCartney C.A., Cutler A.J., Nicholson P., Feurtado J.A. Dominant inhibition of awn development by a putative zinc-finger transcriptional repressor expressed at the *B1* locus in wheat. *New Phytol.* 2020;225:340-355. DOI 10.1111/nph.16154.
- Kato K., Miura H., Akiyama M., Kuroshima M., Sawada S. RFLP mapping of the three major genes, *Vrn1*, *Q* and *B1*, on the long arm of chromosome 5A of wheat. *Euphytica*. 1998;101(1):91-95. DOI 10.1023/A:1018372231063.
- Le Couviour F., Faure S., Poupard B., Flodrops Y., Dubreuil P., Praud S. Analysis of genetic structure in a panel of elite wheat varieties and relevance for association mapping. *Theor. Appl. Genet.* 2011; 123(5):715-727. DOI 10.1007/s00122-011-1621-9.
- Mackay I.J., Bansept-Basler P., Barber T., Bentley A.R., Cockram J., Gosman N., Greenland A.J., Horsnell R., Howells R., O'Sullivan D.M., Rose G.A., Howell P.J. An eight-parent multiparent advanced generation inter-cross population for winter-sown wheat: creation, properties, and validation. *G3 (Bethesda)*. 2014;4(9):1603-1610. DOI 10.1534/g3.114.012963.
- Peleg Z., Saranga Y., Fahima T., Aharoni A., Elbaum R. Genetic control over silica deposition in wheat awns. *Physiol. Plant.* 2010;140(1): 10-20. DOI 10.1111/j.1399-3054.2010.01376.x.
- Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91(6-7):1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912.
- Rebetzke G.J., Jimenez-Berni J.A., Bovill W.D., Deery D.M., James R.A. High-throughput phenotyping technologies allow accurate selection of stay-green. *J. Exp. Bot.* 2016;67(17):4919-4924. DOI 10.1093/jxb/erw301.

- Ronin Y., Mester D., Minkov D., Korol A. Building reliable genetic maps: different mapping strategies may result in different maps. *Nat. Sci.* 2010;2(6):576-589. DOI 10.4236/ns.2010.26073.
- Ronin Y., Minkov D., Mester D., Akhunov E., Korol A. Building ultra-dense genetic maps in the presence of genotyping errors and missing data. In: *Advances in Wheat Genetics: from Genome to Field: Proc. of the 12th Int. Wheat Genetics Symposium*. Springer Nature, 2015; 127-133. DOI 10.1007/978-4-431-55675-6.
- Sears E.R. The aneuploids of common wheat. *Missouri Agr. Expt. Stn. Res. Bull.* 1954;572:1-59.
- Sears E.R. Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In: Riley R., Lewis K.R. (Eds.). *Chromosome Manipulations and Plant Genetics*. Springer, Boston, MA. 1966;29-45. DOI 10.1007/978-1-4899-6561-5_4.
- Sourdille P., Cadalen T., Gay G., Gill B., Bernard M. Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. *Plant Breed.* 2002;121(4):320-324. DOI 10.1046/j.1439-0523.2002.728336.x.
- Voorrips R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 2002;93(1):77-78. DOI 10.1093/jhered/93.1.77.
- Watkins A.E., Ellerton S. Variation and genetics of the awn in *Triticum*. *J. Genet.* 1940;40(1-2):243-270.
- Yoshioka M., Iehisa J.C.M., Ohno R., Kimura T., Enoki H., Nishimura S., Nasuda S., Takumi S. Three dominant awnless genes in common wheat: Fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176148. DOI 10.1371/journal.pone.0176148.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта АААА-А16-116061750188-4 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00483-а). Публикация подготовлена при поддержке программы РУДН (получатель О.Б. Добровольская, анализ развивающего соцветия).

М. Т. и П. М. благодарят проект QK1910343 Министерства сельского хозяйства Чешской Республики. Авторы благодарят О.А. Рошину (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) за техническую помощь при выполнении работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.12.2019. После доработки 05.07.2020. Принята к публикации 14.07.2020.

Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы

В.Н. Шмаков¹, Ю.М. Константинов^{1, 2} 

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

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

 e-mail: yukon48@mail.ru

Аннотация. Клональное размножение хвойных с использованием соматического эмбриогенеза имеет существенное значение для селекции древесных видов, реализации программ лесоразведения и лесовосстановления. В сочетании с криоконсервацией соматический эмбриогенез создает основу для получения хозяйственно ценных линий клонов и элитных генотипов. Использование в промышленных масштабах в лесном хозяйстве таких генетически проверенных линий клонов может значительно увеличить продуктивность лесов по сравнению с любыми доступными традиционными методами улучшения древесных культур. Лиственница считается одним из основных кандидатов для широкомасштабного лесовосстановления не только за счет обширности занимаемых ареалов, но и благодаря уникальному качеству ее древесины, быстрому росту и высокой экологической пластичности. Однако большинство видов лиственницы характеризуется неравномерностью урожаев и чрезвычайно низким качеством семян. В связи с этим получение посадочного материала для лесовосстановления из семян лиственниц на семенных плантациях нецелесообразно, но может быть успешно реализовано в программах по лесоразведению с применением технологий соматического эмбриогенеза. Исследования по соматическому эмбриогенезу лиственницы проводятся уже более тридцати лет, что позволило накопить значительный опыт в данной области. К настоящему времени изучены условия инициации и поддержания эмбриогенных культур, формирования и развития соматических зародышей. Достигнут значительный прогресс в изучении как факторов, влияющих на эти процессы, так и молекулярных механизмов, лежащих в основе различных этапов эмбриогенеза. Однако имеющихся на сегодняшний день знаний о соматическом эмбриогенезе представителей рода *Larix* все еще недостаточно для разработки технологий получения селекционно-ценного растительного материала *in vitro*. В обзоре проведен анализ современного состояния исследований по проблеме соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix*. Особое внимание уделено вопросам выбора эксплантов для соматического эмбриогенеза, составу сред для культивирования, зависимости потенциала соматического эмбриогенеза от продолжительности культивирования, генетическому контролю соматического эмбриогенеза. Ключевые слова: *Larix*; соматический эмбриогенез; генетический контроль.


Для цитирования: Шмаков В.Н., Константинов Ю.М. Соматический эмбриогенез представителей рода *Larix*: состояние и перспективы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):575-588. DOI 10.18699/VJ20.651

Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives

V.N. Shmakov¹, Yu.M. Konstantinov^{1, 2} 

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

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

 e-mail: yukon48@mail.ru

Abstract. Clonal propagation of conifers using somatic embryogenesis is essential for the selection of tree species, and for the implementation of afforestation and reforestation. In combination with cryopreservation, somatic embryogenesis creates the basis for the development of economically valuable lines of clones and elite genotypes. The industrial use of such genetically verified clone lines in forestry can significantly increase forest productivity compared to any conventional methods for improving tree crops that are available. Larch is considered as one of the main conifer candidates for large-scale reforestation, not only due to the vastness of its habitat, but also due to the unique quality of its wood, rapid growth and high ecological plasticity. However, the vast majority of larch species are characterized by uneven yields and extremely low seed quality. In this regard, obtaining planting material for reforestation from larch seeds on seed plantations is not advisable, but can be successfully implemented in afforestation programs using somatic embryogenesis technologies. Research on the somatic embryogenesis of larch has been conducted for over 30 years, which allowed considerable experience in this field to be accumulated. To date, the conditions for the initiation and maintenance of embryogenic cultures, as well as for the formation and development of somatic embryos have been determined. Significant progress has been made in the study of both the factors affecting these processes and the molecular mechanisms that underlie the various stages of embryogenesis. Nevertheless, despite the successes achieved, knowledge available today on the somatic embryogenesis of representatives of the genus *Larix* is still not enough to develop technologies for producing valuable plant-breeding material *in vitro*. This review analyzes the current state of

research on the problem of somatic embryogenesis of representatives of the genus *Larix*. Particular attention is paid to the choice of explants for somatic embryogenesis, the composition of the media for cultivation, the dependence of the potential of somatic embryogenesis on the duration of cultivation, and the genetic control of somatic embryogenesis. Key words: *Larix*; somatic embryogenesis; genetic control.

For citation: Shmakov V.N., Konstantinov Yu.M. Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):575-588. DOI 10.18699/VJ20.651

Введение

Представители рода *Larix* широко распространены в умеренной и холодных (субарктических и субальпийских) территориальных зонах планеты (Gowere, Richards, 1990; Kim, 2015). Род *Larix* включает от десяти до двадцати пяти видов, распространенных в Северном полушарии на трех континентах: в Северной Америке, Европе и Азии (Дылис, 1981; Koropachinsky, Milyutin, 2013; Pâques et al., 2013). В лесном фонде нашей страны леса с господством лиственницы занимают первое место и по площади (около 37 %, 264 млн га), и по запасу древесины (31 %, 25.2 млрд м³), существенно превосходя другие породы (Биоразнообразие..., 2010; Рысин, 2010). Вопрос о точном количестве видов лиственницы в определенной степени спорный из-за легкости скрещивания в естественных условиях и производства гибридов, которые, в свою очередь, продолжают гибридизироваться (Wei, Wang, 2003; Koropachinsky, Milyutin, 2013).

Лиственница считается одним из основных кандидатов для широкомасштабного лесовосстановления и генетического улучшения не только из-за обширности занимаемых ареалов, но также в силу уникального качества ее древесины, быстрого роста и высокой экологической пластичности (Gowere, Richards, 1990; Bailian, Wyckoff, 1994). Это единственный широко распространенный политипный листопадный род хвойных. Отчасти благодаря этому качеству многие лиственницы могут выдерживать экстремальные зимние температуры и низкий уровень влажности (Bonga et al., 1995). Что касается практического использования представителей рода *Larix* для лесовосстановления, то оно весьма затруднено из-за низкой продуктивности и качества семян (Lelu et al., 1994a; Zhang Y. et al., 2012; Третьякова и др., 2015). Следовательно, получать посадочный материал для лесовосстановления из семян лиственниц на семенных плантациях нецелесообразно. Задача может быть решена с помощью методов клонального размножения зародышей или проростков, полученных из ограниченного количества семян (Munoz-Concha, 2017). У *Larix* это достигается путем черенкования – укоренения стеблей, взятых от молодых саженцев и выращенных в условиях теплицы. Альтернатива данному методу – использование системы культивирования соматических зародышей, позволяющее получить неограниченное количество сеянцев с одинаковым генетическим составом, так как они являются производными одного семени (Attree, Fowke, 1993; Isah, 2016).

Соматический эмбриогенез может оказаться гораздо более эффективным, чем традиционное черенкование. Клеточные линии, продуцируемые соматическими зародышами, могут поддерживаться в ювенильном состоянии в течение неограниченного времени путем их криоконсервации. Криоконсервация позволяет прово-

дить длительные полевые испытания клонированных линий. Вместе с тем часть этих линий поддерживается в физиологическом ювенильном состоянии до тех пор, пока полевые испытания не покажут, какие из линий наиболее предпочтительны для массового производства потомства. Это делает возможным отбор внутри семей, что не применимо к укоренению черенками (Park, Bonga, 1992; Bonga, 2016). Кроме того, технология соматического эмбриогенеза может ускорить традиционные программы лесовосстановления за счет сокращения периода, необходимого для получения генетически улучшенных деревьев (Kim, 2015). К сожалению, для хвойных крупномасштабное использование соматического эмбриогенеза с целью практического размножения часто ограничивается лишь несколькими выбранными генотипами, а сам процесс остается трудоемким и дорогостоящим. Для его универсального применения необходимо решить еще много проблем (Bonga, 2016; Klimaszewska et al., 2016).

Настоящий обзор посвящен анализу состояния исследований соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix*. Можно надеяться, что намечающееся благодаря применению методов геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики ускорение научного прогресса в этой области позволит разработать новые, более эффективные протоколы соматического эмбриогенеза для внедрения в программы селекции, лесоразведения и лесовосстановления.

Выбор типа экспланта для соматического эмбриогенеза лиственниц

Впервые метод соматического эмбриогенеза для представителей рода *Larix* был успешно применен в 1985 г. для *L. decidua* (Nagmani, Bonga, 1985). С тех пор достигнут большой прогресс в этой области для большинства видов лиственницы и ее гибридов (табл. 1). Как отмечено в многочисленных исследованиях, формирование эмбрионных культур зависит от типа и стадии развития, на которой находится эксплант.

Первоначально работы проводились в основном с использованием в качестве эксплантов мегагаметофитов *L. decidua*, *L. leptolepis* (= *L. kaempferi*) и их реципрокных гибридов *L. × eurolepis* и *L. × leptoeuropaea* (von Aderkas et al., 1987, 1990; von Aderkas, Bonga, 1988; Rohr et al., 1989), что позволило получить гаплоидные эмбрионные культуры и на их основе соматические зародыши. Формировавшиеся из последних растения чаще всего представляли собой миксоплоиды с преобладанием диплоидных клеток (von Aderkas, Anderson, 1993; von Aderkas, Bonga, 1993; von Aderkas et al., 2002). В это же время были предприняты успешные попытки инициации соматических зародышей из протопластов *L. decidua* и гибрида *L. × eurolepis* (*L. decidua* × *L. leptolepis*) (Klimaszewska, 1989a; von Ader-

Таблица 1. Вид *Larix*, тип экспланта и базовая среда культивирования, использованные для инициации соматического эмбриогенеза

Вид	Тип экспланта	Базовая среда	Частота индукции	Лит. источник
<i>L. decidua</i>	НПС33	LM	Н. д.	Cornu, Geoffrion, 1990
	НС33	MSG	20	von Aderkas et al., 1990
	333	MSG	5	Lelu et al., 1994c
	Мегагаметофит	MS, 1/2 MS, LM, 1/2 LM	0.3	Nagmani, Bonga, 1985
<i>L. leptolepis</i>	НС33	MSG	15	von Aderkas et al., 1990
	НПС33	LM, LP, MS	59–67	Kim et al., 1998
	333	LP, LM	22–38	Kim, 2015
	Мегагаметофит	MSG	2	von Aderkas et al., 1990
<i>L. × eurolepis</i>	НПС33	MSG, DCR, LM	6–12	Klimaszewska, 1989b
	НС33	MSG	2	Lelu et al., 1994c
<i>L. × leptoeuropaea</i>	НС33	MSG	26	»
	НПС33	MSG	62	»
	333	MSG	8	»
	С3, семядоли	MSG	12–98	Saly et al., 2002
	С3, хвоя	MSG	3	Lelu et al., 1994c
<i>L. occidentalis</i>	НС33	1/2 LM	70	Thompson, von Aderkas, 1992
	НПС33	1/2 LM	30	»
	333	1/2 LM	1	von Aderkas et al., 1995
<i>L. sibirica</i>	НПС33	MSG	67–98	Белоруссова, Третьякова, 2008
<i>L. gmelinii</i>	НПС33	1/2 MS, MSG	50–81	Третьякова, Барсукова, 2012
<i>L. sukaczewii</i>	НПС33	1/2 MS, MSG	98	»
<i>L. laricina</i>	НПС33	MSG	44	Klimaszewska et al., 1997
<i>L. olgensis</i>	НС33	MS, S	Н. д.	Song et al., 2016
<i>L. principis-rupprechtii</i>	НС33	S, B	Н. д.	Qi et al., 2000

Примечание. Тип экспланта: 333 – зрелый зиготический зародыш, НПС33 – незрелый предсемядольный зиготический зародыш, НС33 – незрелый семядольный зиготический зародыш, С3 – соматический зародыш.

kas, 1992; Koriach, Zoglauer, 1995; Pattanavibool et al., 1998). Но исследования, проведенные в последующие годы, доказали, что соматический эмбриогенез инициируется наиболее эффективно из незрелых зиготических зародышей. Этот факт установлен как для видов рода *Larix*, так и для других представителей хвойных (Chen et al., 2010; Bonga, 2016; Sarmast, 2018; Шуклина, Третьякова, 2019). При этом чаще всего используются зиготические зародыши на предсемядольной и семядольной стадиях развития (Lelu et al., 1994a; Ogita et al., 1999a; Lu et al., 2005; Lelu-Walter, Râques, 2009), хотя получены положительные результаты при применении зиготических зародышей на более ранних или более поздних стадиях развития (Wang et al., 2007; Белоруссова, Третьякова, 2008; Wang, Yang, 2010). Имеется незначительный прогресс в инициации соматического эмбриогенеза из зрелых зародышей. Так, для гибрида *L. × leptoeuropaea* (*L. leptolepis* × *L. decidua*) хвоя соматических проростков давала эмбриональные массы с меньшей частотой (3 %), чем зрелые соматические зародыши того же генотипа (83 %) (Lelu et al., 1994c). Значительно больше данных об успешной инициации соматического эмбриогенеза из зрелых зародышей известно для представителей других таксономических групп хвой-

ных. Так, эмбриогенные культуры получены из зрелых зиготических зародышей таких видов, как *Pinus gerardiana*, *P. kesya*, *P. koraiensis*, *Abies alba*, *A. nordmanniana*, *A. balsamea*, *A. fraseri*, *Picea abies*, *P. glauca*, *P. morrisonicola*, *P. likiangensis*, *P. omorika* и др. (Yeung, Thorpe, 2005; Vooková, Kormuřák, 2007; Chen et al., 2010; Шуклина, Третьякова, 2019).

Существенный недостаток использования эксплантов из ювенильного материала (зиготические зародыши) для клонального размножения, в том числе с помощью соматического эмбриогенеза, заключается в невозможности применения материала от растений, генетический потенциал которых уже проявился фенотипически (взрослые деревья со строго определенными характеристиками) (Bonga, 2017). Поэтому в качестве первичного экспланта наибольший интерес представляют вегетативные части растений (сегменты побегов и зрелой хвои). Так, в ряде работ говорится о возможности получения соматического эмбриогенеза из растительного материала от взрослых растений хвойных: примордиальных меристем 2- и 10-летних соматических растений *Picea glauca* (Klimaszewska et al., 2011; Klimaszewska, Rutledge, 2016), хвои соматических растений в возрасте от 2 мес. до 3 лет *Picea abies*

(Harvengt et al., 2001), вегетативных апексов побегов, адвентивных почек и хвой взрослых деревьев *Pinus kestiya*, *P. roxburghii*, *P. sylvestris*, *P. patula*, *P. wallichiana*, *P. pinea*, *P. radiata*, *P. pinaster* (Trontin et al., 2016a; Шуклина, Третьякова, 2019).

Трудности в использовании растительного материала от взрослых деревьев связаны с тем, что на вегетативной и репродуктивной стадии их развития происходят существенные физиологические, биохимические, генетические и другие изменения в растительных тканях. Это значительно снижает вероятность и частоту эмбриогенеза из эксплантов взрослых деревьев (Klimaszewska et al., 2011). При этом с увеличением зрелости экспланта постепенно репрессируется генетическая программа для индукции эмбриогенной ткани, а после того как образуется апикальная меристема, потенциал для получения эмбриогенной ткани полностью нарушается (Bonga et al., 2010).

Среди прочих негативно действующих факторов можно отметить следующие. Из-за присутствия множества соединений, образуемых и выделяемых в питательные среды растениями, происходит ингибирование деления, роста клеток, наблюдаются нарушения эмбриогенного ответа и нормальной экспрессии генов, участвующих в индукции соматического эмбриогенеза (Isah, 2016; Sarmast, 2018). Одной из важных причин названных нарушений является изменение паттерна метилирования геномной ДНК (von Aderkas, Bonga, 2000). Для преодоления неспособности материала взрослых растений формировать эмбриогенную культуру в ряде случаев применяют процедуру реювенилизации тканей. Для этого экспланты помещают в различного рода стрессовые условия: голодание, холододовая обработка при низких положительных температурах или использование в составе сред для культивирования тяжелых металлов (Bonga, 1996, 1997; Wendling et al., 2014). Процесс реювенилизации стимулируется изменением рН среды культивирования, использованием ферментов деградации клеточной стенки, понижением уровня эндогенных антиоксидантов (глутатион, аскорбиновая кислота, витамин Е) путем изменения содержания экзогенных ауксинов (von Arnold, 1987; Earnshaw, Johnson, 1987; Mo et al., 1996). Показано, что воздействие ауксина повышает уровень метилирования ДНК, что в свою очередь приводит к стимуляции деления клеток, их дедифференцировке, тем самым стимулируя инициацию соматического эмбриогенеза (von Aderkas, Bonga, 2000).

Кроме того, ткани взрослых деревьев хвойных пород содержат множество поверхностных микроорганизмов, которые снижают способность тканей к регенерации (Третьякова и др., 2014). К сожалению, до настоящего времени не разработаны эффективные методы борьбы с таким бактериальным загрязнением. Известно лишь несколько процедур, позволяющих уменьшить, но не устранить полностью такое загрязнение в системах культуры тканей растений (Sarmast, 2018).

Несмотря на многолетние усилия исследователей (Chalupa, 1989; Bonga, Pond, 1991; Bonga, 1996, 2004; Ewald, 1998), соматический эмбриогенез от зрелых деревьев лиственницы до сих пор не получен и остается актуальной задачей для будущих исследований (von Aderkas, Bonga, 2000; Klimaszewska et al., 2016).

Влияние генотипа исходного растения на соматический эмбриогенез лиственниц

По всей вероятности, основным фактором (помимо типа экспланта), который определяет, будут ли формироваться соматические зародыши, является генотип родительских деревьев (Третьякова, Барсукова, 2010; Bonga et al., 2010). При этом на инициацию соматического эмбриогенеза у многих хвойных влияет аддитивная генетическая изменчивость, предоставляющая возможность селекции на усиление признака инициации соматического эмбриогенеза (Park, 2002). Соматический эмбриогенез можно получить только у отдельных генотипов, что значительно затрудняет использование этой технологии для практического крупномасштабного размножения хвойных.

Эксперименты по изучению генетического контроля инициации соматического эмбриогенеза проводились на представителях нескольких родов хвойных, в том числе рода *Larix* (Klimaszewska et al., 2016). В работе И.Н. Третьяковой с коллегами (Третьякова и др., 2015) было задействовано 200 деревьев *L. sibirica*, и только один генотип дал начало стабильно поддерживаемой эмбриогенной культуре. Анализ полученных результатов свидетельствует о более сильном материнском, чем отцовском, влиянии на инициацию культуры (Третьякова и др., 2015; Klimaszewska et al., 2016). Материнский эффект на стадии инициации может быть объяснен как генотипом, так и стадией развития или физиологического состояния материнского дерева и унаследованными материнскими аллелями зиготического зародыша (Niskanen et al., 2004).

Состав сред для культивирования эмбриогенных масс и соматических зародышей лиственниц

На рост и развитие эмбриогенной культуры хвойных, в том числе представителей рода *Larix*, сильное влияние оказывает состав питательной среды. Выбор солей (микро- и макроэлементов) и органических составляющих, коррекция их баланса и концентраций играют важную роль как в инициации каллусогенеза, так и в дальнейшем поддержании полученной культуры *in vitro* (Pâques et al., 2013). При этом подбор состава питательных сред часто зависит от видовой принадлежности растения и типа используемого в качестве экспланта материала (Isah, 2016).

В зависимости от решаемых задач и исходного растительного материала, в работах по соматическому эмбриогенезу лиственниц применяются следующие базовые среды (см. табл. 1): LM (полный или половинный состав (1/2 LM)) (Litvay et al., 1985), MS (полный или половинный состав (1/2 MS)) (Murashige, Skoog, 1962), MSG (Becwar et al., 1990), LP (Quoirin, Lepoivre, 1977), S (Ewald et al., 1995), B (Ewald et al., 1997), АИ (Третьякова и др., 2012), DCR (Gupta, Durzan, 1985), WPM (Lloyd, McCown, 1980). На всех этапах культивирования базовая среда дополняется такими органическими соединениями, как: L-глутамин в концентрации от 0.05 до 1.5 г/л; мио-инозитол (0.1–1.0 г/л); гидролизат казеина (0.5–1.0 г/л); аскорбиновая кислота (0.4 г/л) (Cornu, Geoffrion, 1990; von Aderkas et al., 1990; Lelu et al., 1994c; Klimaszewska et al., 1997; Третьякова и др., 2015; Kim, 2015).

Ключевыми компонентами питательной среды, контролирующими весь процесс соматического эмбриогенеза, являются фитогормоны (von Aderkas et al., 2001; Vondráková et al., 2016). Их состав и соотношения зависят от стадии развития соматических зародышей. На этапе инициации эмбриогенных масс обязательно присутствие в среде эндогенных ауксинов в сочетании с цитокининами. Исключение составляют виды *Abies*, у которых для инициации эмбриогенеза чаще всего необходимы только цитокинины (Pullman, Frampton, 2018). В большинстве исследований по эмбриогенезу у представителей рода *Larix* описано использование 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (1.0–2.0 мг/л) совместно с 6-бензиламинопурином (0.5–1.0 мг/л) (Klimaszewska, 1989a, b; Korlach, Zoglaue, 1995; Lelu-Walter, Pâques, 2009; Tretyakova et al., 2019). В ряде работ упоминается применение в качестве ауксинов нафтилуксусной кислоты, пиклорама или 4-хлорфеноксиуксусной кислоты в концентрации 1.0 мг/л (Qi et al., 2004; Kim, 2015) и кинетина (0.1–5.0 мг/л) как представителя цитокининов (Cornu, Geoffrion, 1990; Qi et al., 2000; Song et al., 2016). Индолилуксусная кислота, как показано для *L. leptolepis*, играет важную роль в контроле прорастания соматических зародышей (Li Z. et al., 2017a, b).

На этапе созревания соматических зародышей наиболее важным компонентом питательной среды становится абсцизовая кислота (Lelu et al., 1994b, 1995). Оптимальное содержание этого фитогормона (от 0.01 до 32.0 мг/л) и сроки культивирования соматических зародышей в его присутствии (1–4 недели) значительно варьируют у разных видов лиственниц (Label, Lelu, 1994, 2000; von Aderkas et al., 1995, 2002, 2015; Gutmann et al., 1996; Klimaszewska et al., 1997; Ogita et al., 1999b; Kim, Moon, 2007; Третьякова и др., 2012; Song et al., 2018). Для улучшения процесса созревания соматических зародышей иногда совместно с абсцизовой кислотой используют: индолилмасляную кислоту в концентрации 1.0 мг/л (Третьякова и др., 2012); 5.0 мг/л ингибитора транспорта ауксина 2-(п-хлорофенокси)-2-метилпропионовой кислоты (PCIB); 5.0 мг/л флороглюцинола (синергист ауксина) (Kim, Moon, 2009) или нитрат серебра (2.0–5.5 мг/л) (Saly et al., 2002; Song et al., 2018). Улучшение качества соматических зародышей, их прорастания и формирования полноценных растений достигается путем сочетания абсцизовой кислоты с активированным углем (0.5–10 г/л), который вводится в питательную среду на стадии предсозревания соматических зародышей (Harry et al., 1991; Qi et al., 2004; Umehara et al., 2004; Третьякова и др., 2016; Klimaszewska et al., 2016). Учитывая то, что созревающие соматические зародыши должны подвергаться воздействию водного стресса аналогично развивающимся зиготическим зародышам *in vivo*, для снижения доступной воды в питательную среду вводят такие вещества, как полиэтиленгликоль 3000–4000 в концентрации 4–10 %, сахарозу в повышенной концентрации (3–8 %) или мальтозу (3 %), гелеобразователи гелрайт или фитагель (0.3–0.4 %) (Klimaszewska et al., 1997; Ma et al., 1998; Qi et al., 2004; Lu et al., 2005; Teyssier et al., 2011; Третьякова, Барсукова, 2012; Третьякова и др., 2012; Song et al., 2018). На начальных стадиях инициации развития эмбриогенной культуры концентрация используемой сахарозы составляет 1–3 %

(von Aderkas et al., 1987; Lelu et al., 1994c; Kim, 2015), а в качестве гелеобразователя применяется чаще всего агар в концентрации 0.7 % (Klimaszewska, 1989b; von Aderkas et al., 1990; Белорусова, Третьякова, 2008).

Помимо изучения положительного действия определенных соединений, входящих в состав сред для культивирования, на различные стадии соматического эмбриогенеза, исследованы также вещества, присутствие которых в среде негативно влияет на культуру *in vitro*. Для *L. × leptoeuropaea* было показано, что обогащение атмосферы этиленом или добавление 2-хлорэтилфосфоновой кислоты (5.0 и 10.0 мг/л) или 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (1.0–10.0 мг/л) в среду культивирования сильно снижало индукцию вторичного соматического эмбриогенеза (Saly et al., 2002). Ванилилбензиловый эфир и 4-[(фенилметокси)метил]фенол ингибировали раннее развитие соматических зародышей, а именно дифференцировку суспензоров, у *L. leptolepis* (Umehara et al., 2005, 2007). Эти вещества присутствуют в достаточных для ингибирования количествах в суспензионной культуре с высокой плотностью клеток и в значительно меньшей, не оказывающей негативного влияния концентрации – в культуре с низкой плотностью клеток (Umehara et al., 2004).

К настоящему времени накоплен обширный опыт в исследуемой области, но в связи с низкой эффективностью соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix* работы по оптимизации состава питательной среды, включая специфические сахара, витамины, органические кислоты, модификаторы окислительно-восстановительного потенциала и др., продолжаются.

Зависимость потенциала соматического эмбриогенеза лиственниц от возраста культуры *in vitro*

При инициации и поддержании эмбриогенной культуры значительное внимание уделяется эффективности получения соматических зародышей в культуре *in vitro* в течение длительных периодов времени. Этот вопрос имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. При лесовосстановлении требуется длительное тестирование регенерированных деревьев из отдельных клеточных линий для последующего их широкомасштабного использования. Следовательно, линии культуры ткани должны поддерживаться в функционально неизменном виде до тех пор, пока элитные характеристики полученных из них регенерантов не будут подтверждены экспериментально (Charest, Klimaszewska, 1995). Однако возраст эмбриогенной культуры, т.е. количество субкультивирований, может отрицательно влиять на ее способность к регенерации полноценных соматических зародышей (Pâques et al., 2013). Это прежде всего связано с увеличением скорости и накоплением большого количества мутаций и общей генетической нестабильностью длительно поддерживаемых культур *in vitro* в результате соматической изменчивости (Krutovsky et al., 2014; Klimaszewska et al., 2016).

Как установлено, соматическая изменчивость проявляется на морфологическом, цитологическом (количество и структура хромосом), биохимическом (метаболические нарушения) и молекулярно-генетическом (геномы ядра и органелл) уровнях (Cyr, Klimaszewska, 2002). При этом

частично дифференцированные культуры, такие как эмбриональные массы *in vitro*, демонстрируют меньшую вариабельность, чем истинные культуры каллусного типа (Сур, 1999). К тому же эмбрионные культуры хвойных, в отличие от покрытосеменных, считаются генетически более стабильными (Isabel et al., 1996). Ряд исследований по оценке уровня соматклональной изменчивости в эмбрионных культурах хвойных показал отсутствие каких-либо соматклональных изменений в эмбрионных тканях и у соматических зародышей *Picea abies*, *Picea glauca* × *P. engelmannii*, *Pinus pinea*, *Picea mariana* (Heinze, Schmidt, 1995; Isabel et al., 1996; Cuesta et al., 2008; Krutovsky et al., 2014). В целом эмбрионные культуры представителей рода *Larix* обладают высокой стабильностью (Klimaszewska et al., 2016). Так, у *L. × eurolepis* эмбрионная линия была стабильной и после 4 лет субкультивирования (Pâques et al., 2013), а у *L. leptolepis* – в течение 9 лет (Wang et al., 2007; Lelu-Walter, Pâques, 2009). В последнем случае эмбрионные культуры со временем становились неэмбрионными (Li W. et al., 2013). На протяжении 9 лет не терялась эмбрионность культур *L. decidua*, полученных из гаплоидного материала – мегagamетофитов (Pattanavibool et al., 1995). При этом за время наблюдений почти все линии удвоили ($2n = 24$) число хромосом, но и гаплоидные, и дигаплоидные линии оставались эмбрионными. Дальнейшие исследования (17-летняя культура) показали, что ни одна линия не сохраняла постоянную эмбрионность в течение всего периода культивирования (von Aderkas et al., 2003). В нескольких линиях эмбрионный потенциал был потерян полностью, а в других потеря была временной, так как наблюдалось периодическое восстановление эмбриогенеза. Проллиферативная активность 15 эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* сохранялась в течение 2–8 лет (Пак и др., 2016; Третьякова, Пак, 2018), а плоидность хромосом клеток этих линий не менялась до 2 лет культивирования (Третьякова et al., 2017). Далее были выявлены разброс хромосомных чисел от 24 до 30 и большое количество патологий митоза и клеток с микроядрами (Горячкина и др., 2017). Однако имелись отдельные клеточные линии, у которых генетическая стабильность культур сохранялась до 7 лет. По данным микросателлитного анализа, эмбрионные линии характеризовались слабой аллельной изменчивостью (Третьякова et al., 2017). Тем не менее способность соматических зародышей из длительно поддерживаемых линий к созреванию и прорастанию со временем уменьшалась (Третьякова и др., 2016).

Длительное культивирование эмбрионных масс, приводящее к формированию соматических зародышей и впоследствии растений, может вызывать редкие фенотипические аномалии у *Picea glauca* и *P. mariana* (Isabel et al., 1996; Tremblay et al., 1999) или генетическую нестабильность у *Pinus sylvestris* и *P. pinaster* (Burg et al., 2007; Marum et al., 2009). Изменения в относительном содержании митохондриальной ДНК наблюдались в эмбрионных тканях у *Larix leptolepis*, *L. decidua* и их реципрокных гибридов (DeVerno et al., 1994). Таким образом, несмотря на достаточно высокую стабильность эмбрионных культур представителей рода *Larix*, со временем качество и количество соматических зародышей

изменяются. В связи с этим длительное поддержание данных культур методом регулярных субкультивирований не представляется целесообразным.

Криоконсервация эмбрионных линий

Помимо основной проблемы – снижения или потери эмбрионного потенциала культуры на фоне возможных генетических изменений при длительном поддержании *in vitro*, следует учитывать также высокие трудозатраты при необходимости регулярных субкультивирований и увеличение риска потери материала из-за загрязнения, человеческих ошибок или технических сбоев.

Решением этих проблем может стать периодическая повторная инициация эмбрионных культур. Однако эта достаточно трудоемкая и дорогостоящая процедура не может быть использована для видов, в том числе хвойных, у которых наиболее подходящие экспланты для индукции эмбрионного каллуса доступны лишь в ограниченный период времени года (Ozudogru, Lambardi, 2016).

Другим подходом для преодоления вышеназванных трудностей является применение техники уменьшения скорости роста и увеличения интервалов субкультуры путем инкубации при пониженной температуре (4–5 °C) и низкой интенсивности света (например, 10 мкмоль/м²/с), а также изменения осмотического потенциала среды консервирования, уменьшения поступления неорганических питательных веществ, добавления замедлителей роста в культуральную среду (Hassan, 2017). Хранение в условиях минимального роста – очень простой метод, позволяющий сохранять культуру *in vitro* в течение периода от 6 до 12 месяцев, но не более 3 лет, в зависимости от вида растения (Ozudogru et al., 2010). Более длительное выдерживание культур при таких условиях приводит к резкому падению частоты регенерации растений и повышению числа генетических изменений.

Для долговременного стабильного сохранения эмбрионных культур идеален метод криоконсервации, который обеспечивает их сохранность и стабильность (Charest, Klimaszewska, 1995). Эмбрионные культуры могут храниться в жидком азоте при –196 °C или при –150 °C в паровой фазе азота неограниченно долго без потери ювенильности (Park et al., 1998). Этот метод обеспечивает длительное хранение различных типов тканей и органов, включая кончики побегов, соматические и зиготические зародыши, цельные семена, пыльцу, пыльники и почки (Vendrame, 2018).

Существуют различные типы методов криоконсервации. Традиционные методы основаны на дегидратации, вызванной замораживанием. Среди методов криоконсервации, доступных для эмбрионных культур, наиболее распространено медленное охлаждение материала. В последние годы этот подход позволил разработать эффективные протоколы сохранения материала без потери или с незначительной потерей регенерационной способности в течение продолжительного времени (до 20 лет) для различных видов как широколиственных (*Citrus* ssp., *Hevea brasiliensis*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus suber*, *Q. robur* и др.), так и хвойных деревьев (*Abies cephalonica*, *Picea abies*, *P. glauca*, *P. sitchensis*, *Pinus caribaea*, *P. nigra*, *P. patula* и др.) (Ozudogru, Lambardi, 2016).

Методы криоконсервации разработаны и успешно применяются для гибридов лиственницы *L. × eurolepis* и *L. × leptoeuropaea* (Klimaszewska et al., 1992; Pâques et al., 2013). С их помощью удалось добиться возобновления роста всех протестированных линий после их размораживания. Кроме того, криоконсервация как таковая и ее продолжительность (не менее 18 лет) не оказывали заметного влияния на продуктивность соматических зародышей (Lelu-Walter, Pâques, 2009). На протяжении многих лет криоконсервированные линии гибридных лиственниц используются в экспериментах в обычном режиме. Однако до настоящего момента нет данных о применении методов криоконсервации для длительного сохранения эмбриогенных линий основной части видов лиственниц, кроме указанных двух гибридных форм. В то же время успешный опыт использования методов криосохранения для представителей других родов хвойных открывает возможности для более широкого применения этой технологии длительного сохранения эмбриогенных культур видов лиственниц.

Генетический контроль соматического эмбриогенеза лиственниц

При изучении молекулярных механизмов процесса соматического эмбриогенеза большое внимание уделяется профилированию всего генома на основе транскриптомики, протеомики и метаболомики (Trontin et al., 2016b). Установлено, что в ходе соматического эмбриогенеза *in vitro* клеточных культур видов *Larix* происходят изменения организации митохондриального генома и относительной представленности некоторых геномных областей (De Verno et al., 1994). Для исследования различных этапов соматического эмбриогенеза *L. leptolepis* с использованием метода секвенирования РНК созданы 454 библиотеки, содержащие последовательности кДНК (Zhang Y. et al., 2012). Обнаружено, что 25773 выявленных транскрипта связаны со 160 биохимическими путями первичного и вторичного метаболизма. 78 % генов, экспрессирующихся в эмбриогенезе, были полностью гомологичны таковым *Arabidopsis thaliana*. Гены транскрипционных факторов *LaMYB33* и *LaSCL6* важны для сохранения компетентности и поддержания состояния эмбриогенности у *L. leptolepis* как части эпигенетического комплекса регуляции экспрессии генов (Li S. et al., 2013; Li W. et al., 2014). На стадии раннего эмбриогенеза большую роль играют гены *LdLECI* и *LdWOX2* (*L. decidua*) (Rupps et al., 2016), *LaSERK1* (*L. leptolepis*) (Li L. et al., 2013). Экспрессия генов *LaNFYA1*, *LaNFYA2*, *LaNFYA3* и *LaNFYA4* имеет важное значение на ранних стадиях детерминации и в начале созревания соматических зародышей (*L. leptolepis*) (Zhang L. et al., 2014). На предсемядольной стадии развития соматических зародышей необходима экспрессия генов антиоксидантной защиты – *SOD*, *CAT* и *APX* (*L. leptolepis*) (Zhang S. et al., 2010a). На стадиях инициации и позднего созревания соматических зародышей увеличивается экспрессия генов, связанных с синтезом или транспортом ауксинов, – *LaHDZ31*, *32*, *33* и *34* (*L. leptolepis*) (Li S. et al., 2013; Li Z. et al., 2017b), *LaNIT* (*L. leptolepis*) (Li Z. et al., 2018). Гены *LmAP2L1* (*L. × leptoeuropaea*) (Guillaumot et al., 2008), *LkBBM* (*L. leptolepis* × *L. olgensis*) (Li K. et al.,

2014), *LdBBM* и *LdSERK* (*L. decidua*) (Rupps et al., 2016) наиболее активны на стадии прорастания соматических зародышей. При этом ген транскрипционного фактора *LmAP2L2* конститутивно экспрессируется на всех стадиях эмбриогенеза (*L. × leptoeuropaea*) (Guillaumot et al., 2008).

Стратегия высокопроизводительного секвенирования была использована для идентификации миРНК, участвующих в регуляции соответствующих генов-мишеней на отдельных стадиях соматического эмбриогенеза у *L. leptolepis* (Zhang J. et al., 2012). Для 60 миРНК установлено более 100 генов-мишеней. Дифференциальная экспрессия различных миРНК (miR156, miR159, miR160, miR162, miR165, miR166, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR397, miR398) была обнаружена в эмбриогенных и неэмбриогенных культурах *L. leptolepis* (Zhang J. et al., 2012; Zhang L. et al., 2014; Li S. et al., 2013; Li W. et al., 2013, 2014). У хвойных миРНК регулируют активность большинства генов транскрипционных факторов, в том числе генов, участвующих в процессе эмбриогенеза. Фактор транскрипции *MYB* (*LaMYB33*) идентифицирован в качестве гена-мишени для miR159 (Li W. et al., 2013). В свою очередь гены *LaHDZ31*, *LaHDZ32*, *LaHDZ33* и *LaHDZ34* регулируются miR165/166 (Li Z. et al., 2016). Мишенями miR169 являются *LaNFYA1*, *LaNFYA2*, *LaNFYA3* и *LaNFYA4* (Zhang L. et al., 2014), а гомолог *Larix SCARECROW-LIKE 6* (*LaSCL6*) – мишенью для miR171 (Zang et al., 2019). Посттранскрипционная регуляция этих генов с помощью миРНК может участвовать в поддержании потенциала развития, как описано выше, на различных стадиях соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix*. Идентифицированные у видов *Larix* гены, играющие важную роль в соматическом эмбриогенезе на разных его стадиях, суммированы в табл. 2.

Обсуждая перспективы геномных исследований соматического эмбриогенеза клеточных культур видов *Larix*, можно отметить принципиальную важность выяснения таких важных в теоретическом и прикладном отношении вопросов, как: 1) структурно-функциональные изменения митохондриального генома лиственниц, происходящие в культуре *in vitro*, и возможность их обращения; 2) генетическая регуляция взаимодействия геномов ядра, митохондрий и хлоропластов во время соматического эмбриогенеза. Очевидно, что от решения названных вопросов во многом будет зависеть успешность разработки этой технологии для культуры клеток *in vitro*.

Проведены работы по определению изменений протеома и состава жирных кислот на различных стадиях развития эмбриогенных масс и соматических зародышей ряда видов лиственницы. В результате сравнительного протеомного анализа эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов *L. principis-rupprechtii* обнаружено 503 белка, из них дифференциально регулировался 71 (Zhao et al., 2015b). Кроме того, белки анализировали на трех стадиях развития соматических зародышей того же вида лиственницы: стадии проэмбриогенной массы, стадии глобулярных и семядольных зародышей. Идентифицировано 96 белков, дифференциально экспрессирующихся на разных стадиях развития. Функциональный анализ позволил установить, что содержание белков, участвующих в первичном метаболизме, фосфорилировании и поддер-

Таблица 2. Гены соматического эмбриогенеза у представителей рода *Larix*

Вид	Стадия эмбриогенеза	Идентифицированный ген	Лит. источник
<i>L. kaempferi</i>	Ранний эмбриогенез	<i>miR159, 169, 171, 172</i>	Zhang S. et al., 2010b
	Определение компетентности и поддержание состояния эмбриогенности	MYB-like (<i>MYB33</i>), <i>miR159</i>	Li S. et al., 2013; Li W. et al., 2013
		Scarecrow-like (<i>SCL6</i>), <i>miR171</i>	Li W. et al., 2014; Zang et al., 2019
	Предсемядольные стадии развития соматических зародышей	Superoxide dismutase (<i>SOD</i>), catalase (<i>CAT</i>), ascorbate peroxidase (<i>APX</i>)	Zhang S. et al., 2010a
	Предсемядольные и семядольные стадии развития соматических зародышей	<i>TAS3/miR390, laccase/miR397, plastocyanin/miR398, ARF/miR160, miRNA167, class III HD-ZIP/miR166, miRNA156</i>	Zhang J. et al., 2012
	Все стадии эмбриогенеза	<i>miRNA162, miRNA168</i>	»
	Ранний эмбриогенез	<i>LaSERK1</i>	Li L. et al., 2013
	Ранние стадии детерминации и начало созревания соматических зародышей	<i>LaNFYA1, LaNFYA2, LaNFYA3, LaNFYA4, miR169</i>	Zhang L. et al., 2014
Стадии инициации и позднего созревания соматических зародышей	<i>LaHDZ31, LaHDZ32, LaHDZ33, LaHDZ34, miR165/166</i>	Li Z. et al., 2016, 2017b	
	<i>LaNIT</i>	Li Z. et al., 2018	
<i>L. × marschlinii</i>	Стадии созревания соматических зародышей и их прорастание	Germin-like protein 1 (<i>LmGER1</i>)	Mathieu et al., 2006
	Стадии прорастания соматических зародышей	Apetala 2-like (<i>LmAP2L1</i>)	Guillaumot et al., 2008
	Все стадии эмбриогенеза	Apetala 2-like (<i>LmAP2L2</i>)	»
<i>L. decidua</i>	Ранний эмбриогенез	<i>LdLEC1, LdWOX2</i>	Rupps et al., 2016
	Поздний эмбриогенез, стадии прорастания соматических зародышей	<i>LdBBM, LdSERK</i>	»
<i>L. leptolepis × L. olgensis</i>	Стадии прорастания соматических зародышей	<i>LkBBM</i>	Li K. et al., 2014

жании редокс-потенциала клетки, возрастает в процессе развития соматических зародышей. Изучение общего профиля белков *L. × eurolepis* показало значительные различия в их содержании на отдельных этапах созревания соматических зародышей (Teyssier et al., 2014). Обнаруженные в работе 147 белков участвуют главным образом в первичном метаболизме и стабилизации полученных метаболитов. Так, запасные белки, идентифицированные как леугмин- и вицилин-подобные, появлялись на предсемядольной стадии развития.

При изучении жирнокислотного состава липидов эмбриогенных и неэмбриогенных каллусов *L. sibirica* было обнаружено высокое содержание олеиновой кислоты в суммарных липидах эмбриогенной культуры клеток на фоне более низкого содержания линолевой кислоты по сравнению с неэмбриогенным каллусом (Макаренко и др., 2016). Авторы предложили использовать концентрации этих жирных кислот в качестве маркера эмбриогенного потенциала при отборе перспективных клеточных линий лиственницы сибирской на стадии раннего эмбриогенеза. Выявлены также существенные различия состава и содержания нейтральных липидов в тканях эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий *L. sibirica* (Семёнова и др., 2020). Установлено, что доминирующими липидами двух типов линий являются глицериды. При этом триглицериды и 1,2-диглицериды заметно активнее накапливались в эмбриогенных клеточных линиях, а содержание эфиров стероидов в этих линиях было пониженным.

Несмотря на значительные успехи в понимании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе соматического эмбриогенеза хвойных, в частности представителей рода *Larix*, в настоящее время существует острая потребность в расширении комплексных исследований в этой области с целью получения новых знаний, необходимых для разработки методов и подходов к получению растительного материала *in vitro* и использования его в программах лесовосстановления и лесоразведения.

Метод соматического эмбриогенеза представителей рода *Larix* в селекционных программах лесовосстановления

Клональное размножение отдельных видов хвойных путем соматического эмбриогенеза уже широко используется в плантационном лесовыращивании и при реализации программ мультисортного лесного хозяйства (Multi Variety Forest – MVF) в различных странах мира, прежде всего во Франции, Канаде, Германии, Великобритании, Ирландии, странах Скандинавии, в Китае (Park et al., 2016). Мультисортное лесное хозяйство определяется как использование ряда генетически проверенных сортов древесных видов в условиях производственных лесосеменных плантаций (Weng et al., 2011). Еще в середине 1990-х гг. INRA (Национальный институт сельскохозяйственных исследований) во Франции организовал исследования соматического эмбриогенеза у гибридных видов лиственницы (Pâques et al., 2013). В результате была раз-

работана улучшенная процедура, ведущая к рутинному производству растений-регенерантов из соматических зародышей. Новый протокол был применен для размножения гибрида *L. × leptoeuropaea* сорт REVE-VERT (Lelu-Walter, Râques, 2009). В эти же годы была начата программа селекции гибридной лиственницы *L. × eurolepis* на государственном предприятии Staatsbetrieb Sachsenforst (Германия), которая базировалась на достижениях в области, сочетающей методику клонального размножения и исходного растительного материала, имеющего превосходный генетический фон (контролируемые скрещивания) (Kraft, Kadolsky, 2018). Селекционные программы, включающие в себя биотехнологические подходы соматического эмбриогенеза и генетической инженерии, развернуты в Китае и направлены на улучшение имеющегося генофонда местного вида *L. principis-rupprechtii* (Zhao et al., 2015a). Методы генетической инженерии совместно с соматическим эмбриогенезом лиственниц давно успешно апробированы в лабораторных условиях. При этом для введения генов в клетки эмбрионной культуры и непосредственно в соматические зародыши *L. laricina*, *L. leptolepis*, *L. × eurolepis*, *L. principis-rupprechtii* используется как агробактериальная, так и биобаллистическая трансформация (Klimaszewska et al., 1997; Levée et al., 1997; Qi et al., 2000; Li Z. et al., 2016). В ближайшее время для генетического улучшения хвойных планируется использовать, помимо традиционных методов, бурно развивающиеся и многообещающие технологии геномного редактирования на основе системы CRISPR-Cas, которые уже успешно применены для широколиственных древесных видов, таких как грейпфрут (*Citrus paradisi*), апельсин (*Citrus × sinensis*), яблоня (*Malus domestica*, *M. prunifolia* × *M. pumila*), тополь (*Populus tomentosa*, *P. tremula* × *alba*, *P. tremula* × *tremuloides*) и др. (Sarmast, 2016; Chang et al., 2018).

С целью повышения эффективности селекции деревьев наряду с методами соматического эмбриогенеза и криоконсервации в последние десятилетия успешно применяется технология геномной селекции (Park, 2002). Данная технология на основе совокупности картирования локусов количественных признаков позволяет спрогнозировать фенотип отдельного индивида (Goddard, Hayes, 2007). Таким образом, геномная селекция дает возможность идентифицировать элитные генотипы на очень ранней стадии развития без фенотипирования через полевые испытания и тем самым значительно сократить сроки сортоиспытания в рамках программ лесоразведения (Park et al., 2016).

В нашей стране, благодаря интенсивным исследованиям соматического эмбриогенеза хвойных, в том числе сибирских видов лиственницы, более десяти лет проводившихся сотрудниками Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск) под руководством И.Н. Третьяковой, достигнуты значительные успехи в этой области, начиная с условий инициации эмбрионной культуры и заканчивая проведением полевых испытаний выращенных из соматических эмбрионов растений-регенерантов (Третьякова и др., 2019). Полученные результаты в комплексе с прогрессивными методами криосохранения, создания и отбора элитных генотипов на основе геномной инженерии и геномной селекции могут значительно повысить эффективность традиционных селекционных программ по лесовосстановлению, проводимых в Российской Федерации.

восстановлению, проводимых в Российской Федерации. В качестве наиболее масштабного из подобного рода проектов можно отметить международный проект «Лиственница» при участии Швеции, Норвегии, Финляндии, Исландии, Канады, Китая, Японии, США (Abaimov et al., 2002; Martinsson, 2002). Целью этого проекта, начатого в 1992 г., являются создание коллекции семян четырех видов лиственницы из России (*Larix sukaczewii*, *L. sibirica*, *L. gmelinii* и *L. cajanderi*), изучение генетики этих видов и исследования по разведению и видоизменению популяций, созданных на плантациях в разных частях Северного полушария, отбор перспективных форм и популяций.

Закключение

Соматический эмбриогенез все чаще рассматривают как наиболее перспективный метод клонального размножения хвойных, в частности лиственниц, поскольку он имеет ряд преимуществ перед традиционными технологиями лесоразведения. За более чем 30-летний период с момента первого документированного случая соматического эмбриогенеза у видов *Larix* фронт работ в этой области значительно расширился. Изучены условия инициации, поддержания эмбрионных культур, созревания и прорастания соматических зародышей, регенерации полноценных растений и их выращивания в полевых условиях. На основе методов криоконсервации разработаны протоколы поддержания эмбрионных культур в функциональном ювенильном состоянии в течение длительных периодов времени. Наблюдается прогресс в исследовании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе реализации отдельных этапов развития соматических зародышей.

Несмотря на имеющиеся успехи, ряд вопросов, непосредственно связанных с соматическим эмбриогенезом у видов рода *Larix*, остаются недостаточно изученными. Решение этих вопросов в ближайшем будущем позволит создать научные основы для разработки новых подходов и методов получения качественного растительного материала *in vitro* и использования его в программах широкомасштабного промышленного лесовосстановления и лесоразведения. Можно надеяться также, что объединение усилий и более тесное сотрудничество отдельных научных коллективов, успешно работающих в Российской Федерации по проблеме соматического эмбриогенеза видов *Larix* и других видов хвойных, и применение в этих работах комплексного подхода, использующего методы геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, криосохранения и геномной селекции, будут способствовать ускоренному решению этой планетарного значения биологической проблемы.

Список литературы / References

- Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты. *Онтогенез*. 2008;39(2):106-115.
[Belorussova A.S., Tretyakova I.N. Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: embryological aspects. *Russ. J. Dev. Biol.* 2008;39(2):83-91. DOI 10.1134/S1062360408020045.]
Биоразнообразие лиственниц Азиатской России. Отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2010.
[Efremov S.P., Milyutin L.I. (Eds.). Larch Biodiversity of Asian Russia. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2010. (in Russian)]

- Горячкина О.В., Пак М.Э., Третьякова И.Н. Цитогенетические особенности эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. в культуре *in vitro*. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2017;39: 140-153. DOI 10.17223/19988591/39/9.
[Goryachkina O.V., Park M.E., Tretyakova I.N. Cytogenetic peculiarities of *Larix sibirica* Ledeb. Embryogenic cell lines in *in vitro* culture. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;39:140-153. DOI 10.17223/19988591/39/9. (in Russian)]
- Дылис Н.В. Лиственница. М.: Лесн. пром-сть, 1981.
[Dylis N.V. The Larch. Moscow: Lesnaya Promyshlennost Publ., 1981. (in Russian)]
- Макаренко С.П., Шмаков В.Н., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Семёнова Н.В., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М. Жирнокислотный состав суммарных липидов эмбрионных и неэмбрионных каллусных линий лиственницы. *Физиология растений*. 2016;63(2):267-274. DOI 10.7868/S001533031602010X.
[Makarenko S.P., Shmakov V.N., Dudareva L.V., Stolbikova A.V., Semenova N.V., Tretyakova I.N., Konstantinov Y.M. Fatty acid composition of total lipids in embryogenic and nonembryogenic callus lines of larch. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016;63(2):252-258. DOI 10.1134/S1021443716020102.]
- Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбрионный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro*. *Сиб. лесн. журн.* 2016;1:27-38. DOI 10.15372/SJFS20160103.
[Pak M.E., Ivanitskaya A.S., Dvoynina L.M., Tretyakova I.N. The embryogenic potential of long-term proliferation cell lines of *Larix sibirica in vitro*. *Sibirskij Lesnoj Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science*. 2016;1:27-38. DOI 10.15372/SJFS20160103. (in Russian)]
- Рысин Л.П. Лиственничные леса России. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2010.
[Rysin L.P. Larch Forests in Russia. Moscow: KMK Publ., 2010. (in Russian)]
- Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Пак М.Э., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М., Дударева Л.В. Особенности состава нейтральных липидов эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. *Биол. мембраны*. 2020;37(3):215-223. DOI 10.31857/S0233475520020127.
[Semenova N.V., Shmakov V.N., Park M.E., Tretyakova I.N., Konstantinov Yu.M., Dudareva L.V. Particularities of neutral lipid composition in embryogenic and non-embryogenic calluses lines of *Larix sibirica* Ledeb. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*. 2020;3(in press).]
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Сохранение генофонда хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза *in vitro* – современного метода биотехнологии. *Хвойные бореальной зоны*. 2010;XXVII(1-2):203-206.
[Tretyakova I.N., Barsukova A.V. Preservation of gene pool of siberian conifer species by somatic embryogenesis *in vitro* – modern method of biotechnology. *Khvoynnye Borealnoy Zony = Conifers of the Boreal Area*. 2010;XXVII(1-2):203-206. (in Russian)]
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы. *Онтогенез*. 2012; 43(6):425-435.
[Tretyakova I.N., Barsukova A.V. Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species. *Russ. J. Dev. Biol.* 2012;43(6): 353-361. DOI 10.1134/S1062360412060082.]
- Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез. *Хвойные бореальной зоны*. 2012;XXX(1-2):180-186.
[Tretyakova I.N., Voroshilova E.V., Shuvaev D.N., Pak M.E. The prospects of clonal micropropagation of conifers using *in vitro* culture via somatic embryogenesis. *Khvoynnye Borealnoy Zony = Conifers of the Boreal Area*. 2012;XXX(1-2):180-186. (in Russian)]
- Третьякова А.В., Демина Е.А., Рекославская Н.И., Салаяев Р.К., Столбиков А.С. Особенности получения каллусной культуры пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb. *Изв. Ирк. гос. ун-та. Сер. «Биология. Экология»*. 2014;10:11-23.
[Tretyakova A.V., Demina E.A., Rekoslavskaya N.I., Salyaev R.K., Stolbikov A.S. Peculiar properties of the process of obtaining tissue cultures of *Abies sibirica* Ledeb. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya "Biologiya. Ecologiya" = The Bulletin of Irkutsk State University. Series "Biology. Ecology"*. 2014;10:11-23. (in Russian)]
- Третьякова И.Н., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Продуктивность эмбрионных клеточных линий и их соматическая изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro*. *Лесоведение*. 2015;1: 27-35.
[Tretyakova I.N., Ivanitskaya A.S., Park M.E. *In vitro* productivity and somaclonal variability of embryogenic cell lines of Siberian larch. *Lesovedenie = Russian Journal of Forest Science*. 2015;1: 27-35. (in Russian)]
- Третьякова И.Н., Пак М.Э. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбрионной культуре *in vitro*. *Онтогенез*. 2018; 49(4):251-263. DOI 10.1134/S0475145018010068.
[Tretyakova I.N., Pak M.E. Somatic polyembryogenesis of *Larix sibirica* in embryogenic *in vitro* culture. *Russ. J. Dev. Biol.* 2018; 49(4):222-233. DOI 10.1134/S1062360418040069.]
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Баранова А.А., Лисецкая И.А., Шуклина А.С., Рогожин Е.А., Садыкова В.С. Использование антимикробных пептидов микромицетов рода *Trichoderma* для выхода эмбрионной культуры *Larix sibirica*. *Онтогенез*. 2019; 50(1):41-52. DOI 10.1134/S0475145019010051.
[Tretyakova I.N., Pak M.E., Baranova A.A., Lisetskaya I.A., Shuklina A.S., Rogozhin E.A., Sadykova V.S. Use of antimicrobial peptides secreted by *Trichoderma* micromycetes to stimulate embryogenic cultures of *Larix sibirica*. *Russ. J. Dev. Biol.* 2018;49(6):370-380. DOI 10.1134/S1062360419010053.]
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro*. *Физиология растений*. 2016;63(6):812-822. DOI 10.1007/BF00048321.
[Tretyakova I.N., Park M.E., Ivanitskaya A.S., Oreshkova N.V. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016;63(6):800-810. DOI 10.1134/S1021443716050137.]
- Шуклина А.С., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro*. *Успехи соврем. биологии*. 2019; 139(2):184-195. DOI 10.1134/S004213241902008X.
[Shuklina A.S., Tretyakova I.N. Somatic embryogenesis of species of the genus *Pinus* in culture *in vitro*. *Uspekhi Sovremennoi Biologii = Advances in Current Biology*. 2019;139(2):184-195. DOI 10.1134/S004213241902008X. (in Russian)]
- Abaimov A.P., Barzut V.M., Berkutenko A.N., Buitink J., Martinsen O., Milyutin L.I., Polezhaev A., Putenikhin V.P., Takata K. Seed collection and seed quality of *Larix* spp. from Russia: Initial phase on the Russian-Scandinavian Larch Project. *Eurasian J. For. Res.* 2002;4:39-49.
- Attree S.M., Fowke L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993;35(1):1-35. DOI 10.1007/BF00043936.
- Bailian L., Wyckoff G.W. Breeding strategies for *Larix decidua*, *L. leptolepis* and their hybrids in the United States. *For. Genet.* 1994;1: 65-72.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 1990;20:810-817. DOI 10.1139/x90-107.
- Bonga J.M. Frozen storage stimulates the formation of embryo-like structures and elongating shoots in explants from mature *Larix decidua* and *L. × eurolepis* trees. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1996;46:91-101. DOI 10.1007/BF00034841.
- Bonga J.M. The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *L. × eurolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1997;51:195-200. DOI 10.1023/A:1005932628498.

- Bonga J.M. The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix decidua*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2004;77:43-48. DOI 10.1023/B:TICU.0000016488.79965.b7.
- Bonga J.M. Conifer clonal propagation in tree improvement programs. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016;3-31.
- Bonga J.M. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? *Trees*. 2017;31:781-789. DOI 10.1007/s00468-016-1509-z.
- Bonga J.M., Klimaszewska K., Lelu M.A., von Aderkas P. Somatic embryogenesis in *Larix*. In: Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Acad. Publ., 1995; 3:315-339. DOI 10.1007/978-94-011-0960-4-20.
- Bonga J.M., Klimaszewska K., von Aderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;100:241-254. DOI 10.1007/s11240-009-9647-2.
- Bonga J.M., Pond S.E. Adventitious shoot formation in cultures of 30-year-old *Larix decidua*, *L. leptolepis*, *L. eurolepis*, and *L. laricina* trees. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1991;26:45-51. DOI 10.1007/BF00116609.
- Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. *J. Exp. Bot.* 2007;58:687-698. DOI 10.1093/jxb/erl241.
- Chalupa V. Micropropagation of *Larix decidua* Mill. and *Pinus sylvestris* L. *Biologia Plantarum (Praha)*. 1989;31(5):400-407. DOI 10.1007/BF02876363.
- Chang S., Mahon E.L., MacKay H.A., Rottmann W.H., Strauss S.H., Pijut P.M., Powell W.A., Coffey V., Lu H., Mansfield S.D., Jones T.J. Genetic engineering of trees: progress and new horizons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2018;54:341-376. DOI 10.1007/s11627-018-9914-1.
- Charest P.J., Klimaszewska K. Cryopreservation of germplasm of *Larix* and *Picea* species. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.). *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. (Ser. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 32). Springer, Berlin, Heidelberg, 1995;191-203. DOI 10.1007/978-3-662-03096-7_12.
- Chen S., Chen S., Chen F., Wu T., Wang Y., Yi S. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea likiangensis*. *Biologia. Sect. Botany*. 2010;65(5):853-858. DOI 10.2478/s11756-010-0089-4.
- Cornu D., Geoffrion C. Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 1990;137:25-34. DOI 10.1080/01811789.1990.10827026.
- Cuesta C., Ordás R.J., Fernández B., Rodríguez A. Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2008; 95:125-130. DOI 10.1007/s11240-008-9412-y.
- Cyr D.R. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. In: Jain S., Gupta P., Newton R. (Eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Forestry Sciences. Springer, Dordrecht, 1999;55:239-261. DOI 10.1007/978-94-017-3032-7_10.
- Cyr D.R., Klimaszewska K. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. *Dendrobiology*. 2002;48:41-49.
- DeVerno L.L., Charest R.J., Bonen L. Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of *Larix*. *Theor. Appl. Genet.* 1994; 88:727-732. DOI 10.1007/BF01253977.
- Earnshaw B.A., Johnson M.A. Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants. *Plant Physiol.* 1987;85:273-276. DOI 10.1104/pp.85.1.273.
- Ewald D. Advances in tissue culture of adult larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1998;34(4):325-330. DOI 10.1007/BF02822742.
- Ewald D., Kretzschmar U., Chen Y. Continuous micropropagation of juvenile larch from different species via adventitious bud formation. *Biol. Plant.* 1997;39:321-329. DOI 10.1023/A:1000959621891.
- Ewald D., Weckwerth W., Naujoks G., Zocher R. Formation of embryo-like structures in tissue cultures of different yew species. *J. Plant Physiol.* 1995;147:139-143. DOI 10.1016/S0176-1617(11)81426-4.
- Goddard M.E., Hayes B.J. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 2007;124(6):323-330. DOI 10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x.
- Gower S.T., Richards J.H. Larches: deciduous conifers in an evergreen world. *BioScience*. 1990;40(11):818-826. DOI 10.2307/1311484.
- Guillaumot D., Lelu-Walter M.-A., Germot A., Meytraud F., Gastinel L., Riou-Khamlichi C. Expression patterns of *LmAP2L1* and *LmAP2L2* encoding two-APETALA2 domain proteins during somatic embryogenesis and germination of hybrid larch (*Larix × marschlinisii*). *J. Plant Physiol.* 2008;165:1003-1010. DOI 10.1016/j.jplph.2007.08.009.
- Gupta P.K., Durzan D.J. Shoot multiplication for mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* 1985;4:177-179. DOI 10.1007/BF00269282.
- Gutmann M., von Aderkas P., Labe P., Lelu M.-A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 1996;47(305):1905-1917. DOI 10.1093/jxb/47.12.1905.
- Harry I.S., Thompson M.R., Thorpere T.A. Generation of plantlets from mature embryos of western larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1991; 27(2):89-98. DOI 10.1007/BF02632134.
- Harveng L., Trontin J.F., Reymond L., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*. 2001;213:828-832. DOI 10.1007/s004250100628.
- Hassan M.M. In vitro conservation of date palm somatic embryos using growth-retardant conditions. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.). *Date Palm Biotechnology Protocols Volume II. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1638. New York, NY: Humana Press, 2017; 61-70. DOI 10.1007/978-1-4939-7159-6_6.
- Heinze B., Schmidt J. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica*. 1995;85:341-345. DOI 10.1007/BF00023965.
- Isabel N., Boivin R., Lévassieur C., Charest P.-M., Bousquet J., Tremblay F.M. Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *Am. J. Bot.* 1996;83(9):1121-1130. DOI 10.2307/2446195.
- Isah T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol. Plant.* 2016;38:118. DOI 10.1007/s11738-016-2134-6.
- Kim Y., Moon H. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007;88:241-245. DOI 10.1007/s11240-007-9202-y.
- Kim Y., Moon H. Effect of TIBA, PCIB and phloroglucinol on somatic embryomaturation and germination in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *J. Plant Biotechnol.* 2009;36:230-235. DOI 10.5010/JPB.2009.36.3.230.
- Kim Y.W. Initiation of embryogenic callus from mature zygotic embryos in Japanese larch (*Larix kaempferi*). *J. Plant Biotechnol.* 2015; 42:223-227. DOI 10.5010/JPB.2015.42.3.223.
- Kim Y.W., Youn Y., Noh E.R., Kim J.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1998;55:95-101. DOI 10.1023/A:1006120302512.
- Klimaszewska K. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix × eurolepis*. *Plant Cell Rep.* 1989a;8: 440-444. DOI 10.1007/BF00269044.
- Klimaszewska K. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Science*. 1989b;63(1):95-103. DOI 10.1016/0168-9452(89)90105-2.
- Klimaszewska K., Devantier Y., Lachance D., Lelu M.A., Charest P.J. *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J. For. Res.* 1997;27(4):538-550. DOI 10.1139/x96-208.
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana M., Lambardi M. (Eds.). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1359. New York, NY: Humana Press, 2016;131-166. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6-7.
- Klimaszewska K., Overton C., Stewart D., Rutledge R.G. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of

- 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta*. 2011; 233:635-647. DOI 10.1007/s00425-010-1325-4.
- Klimaszewska K., Rutledge R.G. Is there potential for propagation of adult spruce trees through somatic embryogenesis? In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016;195-210.
- Klimaszewska K., Ward C., Cheliak W.M. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix × eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *J. Exp. Bot.* 1992;43(246):73-79. DOI 10.1093/jxb/43.1.73.
- Korlach J., Zoglauer K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of european larch (*Larix decidua* Mill.). *Plant Cell Rep.* 1995;15:242-247. DOI 10.1007/BF00193728.
- Koropachinsky I.Yu., Milyutin L.I. Natural Hybridization in Woody Plants. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2013.
- Kraft A., Kadolsky M. Hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry). In: Jain S.M., Gupta P. (Eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Forestry Sciences. Vol. 84. Springer, Cham., 2018;149-158. DOI 10.1007/978-3-319-89483-6_11.
- Krutovsky K.V., Tretyakova I.N., Oreshkova N.V., Pak M.E., Kvitko O.V., Vaganov E.A. Somaclonal variation of haploid *in vitro* tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome *de novo* sequencing. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2014;50:655-664. DOI 10.1007/s11627-014-9619-z.
- Label P., Lelu M.-A. Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix × leptoeuropaea*) relation with in planta abscisic acid and abscisic acid glucose ester levels. *Plant Growth Regul.* 1994;15: 175-182. DOI 10.1007/BF00024107.
- Label P., Lelu M.-A. Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*. 2000;109:456-462. DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.100413.x.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1994a;36:107-115. DOI 10.1007/BF00048321.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*): Part 2. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1994b;36:117-127. DOI 10.1007/BF00048322.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can. J. For. Res.* 1994c; 24:100-106. DOI 10.1139/x94-015.
- Lelu M.A., Klimaszewska K., Pflaum G., Bastien C. Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea* Dengler) somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1995;31:15-20. DOI 10.1007/BF02632220.
- Lelu-Walter M.A., Pâques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinii*). Perspectives for breeding. *Ann. For. Sci.* 2009;66:104. DOI 10.1051/forest/2008079.
- Lévéé V., Lelu M.A., Jouanin L., Cornu D., Pilate G. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 1997;16:680-685. DOI 10.1007/s002990050301.
- Li K., Sun X., Han H., Zhang S. Isolation, characterization and expression analysis of the *Baby Boom* (*BBM*) gene from *Larix kaempferi* × *L. olgensis* during adventitious rooting. *Gene*. 2014;551:111-118. DOI 10.1016/j.gene.2014.08.023.
- Li L., Zhang L., Qi L., Han S. Characterization and expression of the *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase 1* (*SERK1*) gene during somatic embryogenesis of *Larix kaempferi*. *For. Res.* 2013;6: 673-680.
- Li S., Li W., Han S., Yang W., Qi L. Stage-specific regulation of four *HD-ZIP III* transcription factors during polar pattern formation in *Larix leptolepis* somatic embryos. *Gene*. 2013;522:177-183. DOI 10.1016/j.gene.2013.03.117.
- Li W., Zhang S., Han S., Wu T., Zhang J., Qi L. Regulation of *LaMYB33* by miR159 during maintenance of embryogenic potential and somatic embryo maturation in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013;113(1):131-136. DOI 10.1007/s11240-012-0233-7.
- Li W., Zhang S., Han S., Wu T., Zhang J., Qi L. The post-transcriptional regulation of *LaSCL6* by miR171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. *Tree Genet. Genomes*. 2014;10(1):223-229. DOI 10.1007/s11295-013-0668-y.
- Li Z., Fan Y., Dang S., Li W., Qi L., Han S. *LaMIR166a*-mediated auxin biosynthesis and signaling affect somatic embryogenesis in *Larix leptolepis*. *Mol. Genet. Genomics*. 2018;293(6):1355-1363. DOI 10.1007/s00438-018-1465-y.
- Li Z., Li S., Zhang L., Han S., Li W., Xu H., Yang W., Liu Y., Fan Y., Qi L. Overexpression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016;127(2):461-473. DOI 10.1007/s11240-016-1071-9.
- Li Z., Li W., Han S., Qi L. Germination ability of somatic embryos in *Larix leptolepis*. *For. Res.* 2017a;6:999-1003.
- Li Z., Zhang L., Li W., Qi L., Han S. *MIR166a* affects the germination of somatic embryos in *Larix leptolepis* by modulating IAA biosynthesis and signaling genes. *Plant Growth Regul.* 2017b;36(4):889-896. DOI 10.1007/s00344-017-9693-7.
- Litvay J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep.* 1985;4:325-328. DOI 10.1007/BF00269890.
- Lloyd G., McCown B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. In: Proc. of the Int. Plant Propagators Soc. 1980;30:421-427.
- Lu S., Zhang S., Qi L., Sun X., Wang J. Somatic embryogenesis from immature embryos of *Larix kaempferi*. *Scientia Silvae Sinicae*. 2005;41(02):48-52.
- Ma Y., Weber M., Dumont-BéBoux N., Webber J., von Aderkas P. Megagametophytes of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and hybrid larch (*Larix × eurolepis*) in culture: multiplication of neck cells and the formation of binucleate cells. *Protoplasma*. 1998;204(3-4): 219-225. DOI 10.1007/BF01280325.
- Martinsson O. The Russian-Scandinavian Larch Project – Seed collection and seed quality. Integrating Tree Breeding and Forestry. In: Haapanen M., Mikola J. (Eds.). Proc. of the Nordic Group for Management of Genetic Resources of Trees, Meeting at Mekrijärvi, Finland, March 23–27, 2001. The Finnish Forest Research Institute Research Papers. 2002;107-108.
- Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M.M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Plant Cell Rep.* 2009;28:673-682. DOI 10.1007/s00299-008-0668-9.
- Mathieu M., Lelu-Walter M.A., Blervacq A.S., David H., Hawkins S., Neutelings G. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Mol. Biol.* 2006;61:615-627. DOI 10.1007/s11103-006-0036-5.
- Mo L.H., Egertsdotter U., von Arnold S. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Ann. Bot.* 1996;77:143-152.
- Munoz-Concha D. Clonal propagation, forest trees. In: Thomas B., Murray B.G., Murphy D.J. (Eds.). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Acad. Press, 2017;433-436. DOI 10.1016/b978-0-12-394807-6.00148-9.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15: 473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nagmani R., Bonga J.M. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.* 1985;15:1088-1091. DOI 10.1139/x85-177.

- Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiol.* 2004;24(11):1259-1265. DOI 10.1093/treephys/24.11.1259.
- Ogita S., Sasamoto H., Kubo T. Maturation and plant recovery from embryogenic cells of Japanese larch: effect of abscisic acid in relation to their morphology. *J. For. Res.* 1999a;4(3):241-244. DOI 10.1007/BF02762255.
- Ogita S., Sasamoto H., Kubo T. Selection and microculture of single embryogenic cell clusters in Japanese conifers: *Picea jezoensis*, *Larix leptolepis* and *Cryptomeria japonica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1999b;35(5):428-431. DOI 10.1007/s11627-999-0061-6.
- Ozudogru E.A., Lambardi M. Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants. In: Germana M., Lambardi M. (Eds.). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* Vol. 1359. New York, NY: Humana Press, 2016;537-550. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6_32.
- Ozudogru E.A., Previati A., Lambardi M. In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants. In: Jain S.M., Ochatt S.J. (Eds.). *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology.* Vol. 589. New York, NY: Humana Press, 2010;303-324. DOI 10.1007/978-1-60327-114-1_28.
- Pâques L.E., Foffová E., Heinze B., Lelu-Walter M.A., Liesebach M., Philippe G. Larches (*Larix* sp.). In: Pâques L.E. (Ed.). *Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives. Managing Forest Ecosystems.* Vol. 25. Springer Science+Business Media, Dordrecht, 2013;13-122. DOI 10.1007/978-94-007-6146-9_2.
- Park Y.S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 2002;59(5-6):651-656. DOI 10.1051/forest:2002051.
- Park Y.S., Barrett J.D., Bonga J.M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1998;34:231-239. DOI 10.1007/BF02822713.
- Park Y.S., Beaulieu J., Bousquet J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees.* Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016; 302-322.
- Park Y.S., Bonga J.M. Conifer micropropagation: its function in tree improvement programs. In: Ahuja M.R. (Ed.). *Micropropagation of Woody Plants.* Kluwer, Dordrecht: Acad. Publ., 1992;457-470. DOI 10.1007/978-94-015-8116-5-27.
- Pattanavibool R., Klimaszewska K., von Aderkas P. Interspecies protoplast fusion in *Larix*: comparison of electric and chemical methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1998;34(3):212-217. DOI 10.1007/BF02822710.
- Pattanavibool R., von Aderkas P., Hanhijarvi A., Simola L.K., Bonga J.M. Diploidization in megagametophyte-derived cultures of the gymnosperm *Larix decidua*. *Theor. Appl. Genet.* 1995;90(5):671-674. DOI 10.1007/BF00222132.
- Pullman G.S., Frampton J. Fraser fir (*Abies fraseri* [Pursh] Poir.). In: Jain S.M., Gupta P. (Eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants.* Forestry Sciences. Vol. 84. Springer, Cham. 2018;33-48. DOI 10.1007/978-3-319-89483-6_3.
- Qi L., Han Y., Li L., Ewald D., Han S. The somatic embryogenesis and establishment of transformation experiment system in *Larix principis-rupprechtii*. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 2000;33(4):357-365.
- Qi L., Han Y., Han S., Wang J., Ewald D. Effects of maltose, NAA and ABA on somatic maturation and radicle rooting of *Larix principis-rupprechtii*. *Scientia Silvae Sinicae.* 2004;40(1):52-57.
- Quoirin M., Lepoivre P. Étude de milleux adates aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 1977;78:439-432.
- Rohr R., von Aderkas P., Bonga J.M. Ultrastructural changes in haploid embryoids of *Larix decidua* during early embryogenesis. *Am. J. Bot.* 1989;76(10):1460-1467. DOI 10.1002/j.1537-2197.1989.tb15127.x.
- Rupps A., Raschke J., Rümmler M., Linke B., Zoglauer K. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to *BABYBOOM (BBM)*, *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*, *WUSCHEL-related HOMEODOMAIN BOX2 (WOX2)* and *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK)* during somatic embryogenesis. *Planta.* 2016; 243(2):473-488. DOI 10.1007/s00425-015-2409-y.
- Saly S., Joseph C., Corbineau F., Lelu M.A., Côme D. Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul.* 2002;37(3): 287-294. DOI 10.1023/A:1020856112765.
- Sarmast M.K. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnol. Rep.* 2016;10(6):309-325. DOI 10.1007/s11816-016-0416-5t.
- Sarmast M.K. In vitro propagation of conifers using mature shoots. *J. For. Res.* 2018;29(3):565-574. DOI 10.1007/s11676-018-0608-7.
- Song Y., Li S., Bai X., Zhang H. Screening and verification of the factors influencing somatic embryo maturation of *Larix olgensis*. *J. For. Res.* 2018;29(6):1581-1589. DOI 10.1007/s11676-018-0694-6.
- Song Y., Zhen C., Zhang H.G., Li S.J. Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Larix olgensis*. *Scientia Silvae Sinicae.* 2016;52(10):45-54.
- Teyssier C., Grondin C., Bonhomme L., Lomenech A.M., Vallance M., Morabito D., Label P., Lelu-Walter M.A. Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia Plantarum.* 2011;141(2):152-165. DOI 10.1111/j.1399-3054.2010.01423.x.
- Teyssier C., Maury S., Beaufour M., Grondin C., Delaunay A., Le Mette C., Ader K., Cadene M., Label P., Lelu-Walter M.A. In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum.* 2014;150(2):271-291. DOI 10.1111/ppl.12081.
- Thompson R.G., von Aderkas P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep.* 1992;11:379-385.
- Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *Am. J. Bot.* 1999;86(10):1373-1381.
- Tretyakova I.N., Kudoyarova G.R., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2019;136:511. DOI 10.1007/s11240-018-01533-y.
- Tretyakova I.N., Maria E.P., Alyona S.I., Alla S.S., Inga A.L. Reproduction and genetic stability of long-term proliferative embryogenic cell lines of *Larix sibirica in vitro*. *Int. J. Cell Sci. Mol. Biol.* 2017;2(4):555592. DOI 10.19080/IJCSMB.2017.02.555592.
- Trontin J.-F., Aronen T., Hargreaves C., Montalbán I.A., Moncaleán P., Reeves C., Quoniou S., Lelu-Walter M.-A., Klimaszewska K. International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees.* Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016a;211-260.
- Trontin J.-F., Klimaszewska K., Morel A., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A. Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germana M., Lambardi M. (Eds.). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* Vol. 1359. New York: Humana Press, 2016b;167-209. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6-8.
- Umehara M., Ogita S., Sasamoto H., Kamada H. Inhibitory factor(s) of somatic embryogenesis regulated suspensor differentiation in suspension culture of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant Biotechnol.* 2004;21(2):87-94. DOI 10.5511/plantbiotechnology.21.87.
- Umehara M., Ogita S., Sasamoto H., Koshino H., Asami T., Fujioka S., Yoshida S., Kamada H. Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant Cell Physiol.* 2005;46(3):445-453. DOI 10.1093/pcp/pci041.
- Umehara M., Ogita S., Sasamoto H., Koshino H., Nakamura T., Asami T., Yoshida S., Kamada H. Identification of a factor that complementarily inhibits somatic embryogenesis with vanillyl benzyl ether

- in Japanese larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2007;43:203-208. DOI 10.1007/s11627-006-9016-3.
- Vendrame W.A. Cryopreservation. Orchid propagation: from laboratories to greenhouses. In: Lee Y.-I., Yeung E.C.-T. (Eds.). *Methods and Protocols, Springer Protocols Handbooks.* Springer Science+Business Media, 2018;283-302. DOI 10.1007/978-1-4939-7771-0_15.
- von Aderkas P. Embryogenesis from protoplasts of haploid european larch. *Can. J. For. Res.* 1992;22(3):397-402. DOI 10.1139/x92-052.
- von Aderkas P., Anderson P. Aneuploidy and polyploidization in haploid tissue cultures of *Larix decidua*. *Physiologia Plantarum.* 1993; 88:73-77. DOI 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01762.x.
- von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis. *Am. J. Bot.* 1988;75(5):690-700. DOI 10.1002/j.1537-2197.1988.tb13491.x.
- von Aderkas P., Bonga J.M. Plants from haploid tissue culture of *Larix decidua*. *Theor. Appl. Genet.* 1993;87:225-228.
- von Aderkas P., Bonga J.M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.* 2000;20:921-928. DOI 10.1093/treephys/20.14.921.
- von Aderkas P., Bonga J.M., Nagmani R. Promotion of embryogenesis in cultured megagametophytes of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.* 1987;17:1293-1296. DOI 10.1139/x87-200.
- von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Diploid and haploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua*, and their reciprocal hybrids. *Can. J. For. Res.* 1990;20:9-14. DOI 10.1139/x90-002.
- von Aderkas P., Lelu M.A., Label P. Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 2001;39:495-502. DOI 10.1016/S0981-9428(01)01271-2.
- von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 2003;75(1):27-34. DOI 10.1023/A:1024614209524.
- von Aderkas P., Rohr R., Sundberg B., Gutmann M., Dumont-BéBoux N., Lelu M.A. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002;69(2):111-120. DOI 10.1023/A:1015245627220.
- von Aderkas P., Teyssier C., Charpentier J.P., Gutmann M., Pâques L., Le Métte C., Ader K., Label P., Kong L., Lelu-Walter M.A. Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix × marschlinii*). *Ann. Bot.* 2015;115:605-615. DOI 10.1093/aob/mcu254.
- von Aderkas P., Thompson R.G., Zaki M., Benkrima L. Somatic embryogenesis in western larch (*Larix occidentalis*). In: Bajaj Y.P.S. (Ed.). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Springer, Berlin, Heidelberg, 1995; 30:378-387. DOI 10.1007/978-3-662-03091-2-25.
- von Arnold S. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Plant Physiol.* 1987;128: 233-244.
- Vondráková Z., Krajňáková J., Fischerová L., Vágner M., Eliášová K. Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. In: Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. (Eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees.* Seoul, Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), 2016;123-169.
- Vooková B., Kormuťák A. *Abies* biotechnology – research and development of tissue culture techniques for vegetative propagation. Global Science Books. Takamatsu, 2007;39-46.
- Wang X., Lu L., Hao H., Teng N., Guo Y., Yang Y., Guo Z., Lin J., Chen T. High-efficiency somatic embryogenesis and morphohistology and histochemistry of somatic embryo development in *Larix leptolepis* Gordon. *For. Stud. China.* 2007;9(3):182-188. DOI 10.1007/s11632-007-0029-8.
- Wang X., Yang Y. Study on the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *J. Anhui Agric. Sci.* 2010;4:2118-2121,2180.
- Wei X., Wang X. Phylogenetic split of *Larix*: evidence from paternally inherited cpDNA *trnT-trnF* region. *Plant Syst. Evol.* 2003;239: 67-77. DOI 10.1007/s00606-002-0264-3.
- Wendling I., Trueman S.J., Xavier A. Maturation and related aspects in clonal forestry. Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forests.* 2014;45:449-471. DOI 10.1007/s11056-014-9421-0.
- Weng Y., Park Y.S., Krasowski M.J., Mullin T.J. Allocation of varietal testing efforts for implementing conifer multi-varietal forestry using white spruce as a model species. *Ann. For. Sci.* 2011;68:129. DOI 10.1007/s13595-011-0014-1.
- Yeung E.C., Thorpe T.A. Somatic embryogenesis in *Picea glauca*. In: Jain S.M., Gupta P.K. (Eds.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants.* Forestry Sciences. Vol. 77. Springer, Dordrecht, 2005;47-58. DOI 10.1007/1-4020-2985-3_5.
- Zang Q., Li W., Qi L. Regulation of *LaSCL6* expression by genomic structure, alternative splicing, and microRNA in *Larix kaempferi*. *Tree Genet. Genomes.* 2019;15:57. DOI 10.1007/s11295-019-1362-5.
- Zhang J., Zhang S., Han S., Wu T., Li X., Li W., Qi L. Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta.* 2012;236:647-657. DOI 10.1007/s00425-012-1643-9.
- Zhang L., Li W., Xu H., Qi L., Han S. Cloning and characterization of four differentially expressed cDNAs encoding *NFYA* homologs involved in responses to ABA during somatic embryogenesis in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2014; 117:293-304. DOI 10.1007/s11240-014-0440-5.
- Zhang S., Han S., Yang W., Wei H., Zhang M., Qi L. Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010a;100:21-29. DOI 10.1007/s11240-009-9612-0.
- Zhang S., Zhou J., Han S., Yang W., Li W., Wei H., Li X., Qi L. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010b;398:355-360. DOI 10.1016/j.bbrc.2010.06.056.
- Zhang Y., Zhang S., Han S., Li X., Qi L. Transcriptome profiling and in silico analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Rep.* 2012;31:1637-1657. DOI 10.1007/s00299-012-1277-1.
- Zhao J., Li H., Fu S., Chen B., Sun W., Zhang J., Zhang J. An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PLoS One.* 2015a;10(3):e0119987. DOI 10.1371/journal.pone.0119987.
- Zhao J., Wang B., Wang X., Zhang Y., Dong M., Zhang J. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015b;120:655-669. DOI 10.1007/s11240-014-0633-y.

ORCID ID

V.N. Shmakov orcid.org/0000-0003-2965-1758
Yu.M. Konstantinov orcid.org/0000-0002-0601-2788

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта СИФИБР СО РАН № 0343-2019-0004 «Физиолого-генетический контроль функций клеточных органелл и разработка принципов их направленной модификации» (номер гос. регистрации AAAA-A17-117011810100-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 14.08.2019. После доработки 26.06.2020. Принята к публикации 06.07.2020.

Выявление дублетных образцов в коллекции сахарной кукурузы с использованием электрофореза зеина

В.В. Сидорова, Ю.А. Керв , А.В. Конарев

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР),

Санкт-Петербург, Россия

 e-mail: kerv@mail.ru

Аннотация. Из всех подвидов *Zea mays* L., возделываемых на земном шаре, самый значимый для мировой экономики – сахарная кукуруза. Ее селекцией занимаются ведущие семеноводческие фирмы и научные учреждения мира. Для удовлетворения возрастающих запросов производства к качеству зерна важное значение имеет правильный подбор местных сортов и линий для гибридизации. Местные (как правило, гетерогенные) сорта – ценный исходный материал для создания самоопыленных линий, что способствует существенному расширению генетической базы используемых в селекции родительских форм. Достоинство сортов сахарной кукурузы и интерес к ним пищевой промышленности позволяют рассматривать генетические ресурсы коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) в качестве потенциально ценного исходного материала для селекции. Целью нашей работы было выявление дублетных образцов в коллекции сахарной кукурузы ВИР. В задачи исследования входило: проведение скрининга 19 местных сортов подвида сахарной кукурузы из коллекции ВИР с разным цветом зерна (9 стародавних местных с синей окраской зрелого зерна, 4 – с белой (бесцветной), 3 – с желтой и 3 – с красной окраской) по электрофоретическим спектрам зеина (белковым маркерам); изучение их биотипного состава и характера генетического полиморфизма, создание паспортной базы данных каждого изученного образца по белковым спектрам; для некоторых сортов, имеющих одинаковое сортовое название, но разные каталожные номера, установление степени идентичности их по биотипному составу с целью исключения дублетов. Электрофорез зеина проводили по стандартной методике ISTA, разработанной с участием отдела биохимии и молекулярной биологии ВИР, в вертикальных пластинах 10 % полиакриламидного геля. Методом электрофореза по спектрам зеина впервые исследованы сорта подвида сахарной кукурузы с разной окраской зерна. Для всех изученных образцов установлена уникальность спектров зеина, что позволяет идентифицировать их по специфичным для них маркерным компонентам. Результаты настоящей работы свидетельствуют о перспективности использования электрофореза зеина для выявления, идентификации и регистрации дублетных образцов в коллекции сортов подвида сахарной кукурузы ВИР.


Ключевые слова: сахарная кукуруза; дублетные образцы; электрофорез зеина; белковые маркеры.

Для цитирования: Сидорова В.В., Керв Ю.А., Конарев А.В. Выявление дублетных образцов в коллекции сахарной кукурузы с использованием электрофореза зеина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):589-597. DOI 10.18699/VJ20.652

Identification of duplicate accessions in the sweet maize collection by means of zein electrophoresis

V.V. Sidorova, Yu.A. Kerv , A.V. Konarev

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

 e-mail: kerv@mail.ru

Abstract. Of all the subspecies of *Zea mays* L. cultivated in the world, sweet maize is the most important for the global economy. The leading seed-growing companies and research institutions around the world are engaged in breeding this crop. To meet the increasing demands of the industry to grain quality, it is important to select appropriate local varieties and lines for hybridization. Local (usually heterogeneous) varieties are a valuable source material for creating self-pollinated lines that contribute to a significant broadening of the genetic base of parental forms used in breeding. The advantages of sweet maize varieties and the interest of the food industry in them make it possible to consider accessions from the maize collection of the N.I. Vavilov Institute (VIR) as a potentially valuable source material for breeding. The present research concentrated on 19 local sweet maize varieties with different grain colors from the VIR collection, that is, 9 varieties with the blue color of ripe grain, 4 with white (colorless) grain, 3 with yellow, and 3 with red. The research included an analysis of zein electrophoretic patterns (protein markers); a study of their biotype composition and the nature of genetic polymorphism, as well as the creation of a protein pattern database for each accession. For a series of accessions with the same varietal name, but different catalog numbers, the degree of their identity was determined from their biotype composition in order to exclude duplication. Zein electrophoresis was carried out in vertical plates of 10 % polyacrylamide gel according to the standard ISTA technique developed with the participation of the

Biochemistry and Molecular Biology Department of VIR. Zein patterns were used for the first time to electrophoretically study sweet maize varieties with different grain colors. Unique zein patterns were established for all the accessions studied, which makes possible their identification by specific marker components. The results of this work characterize zein electrophoresis as a useful tool for the identification and registration of duplicate accessions in the VIR collection of sweet maize varieties.

Key words: sweet maize; duplicate accessions; zein electrophoresis; protein markers.

For citation: Sidorova V.V., Kerv Yu.A., Konarev A.V. Identification of duplicate accessions in the sweet maize collection by means of zein electrophoresis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(6):589-597. DOI 10.18699/VJ20.652

Введение

По мнению многих исследователей, *Zea mays* L. – единственный вид рода *Zea* L., не известный в диком состоянии (Шмараев, 1999; Matsuoka et al., 2002). Первичным очагом формирования примитивной кукурузы была территория Мексики (Piperno, Flannery, 2001; Wu, Messing, 2014), вторичным – нагорья Перу (Жуковский, 1971). По существующим представлениям, подвид сахарной кукурузы (*Zea mays* L. subsp. *saccharata* (Koern.) Zhuk.) характеризуется рецессивными генами *su1* и *su2*, локализованными в четвертой и шестой хромосомах. Ген *su1*, имеющийся у обычной сахарной кукурузы, обеспечивает высокое содержание свободного сахара за счет уменьшения доли крахмала в эндосперме. Дальнейшее увеличение содержания сахара достигается при комбинации с геном *se*, характерным для улучшенной по содержанию сахаров кукурузы. Соединение их в форму *sesu1su1* дает одновременное повышение сахара и сахарозы, при этом у гомозигот (*sesu1su1*) содержание сахаров выше (от 20 до 35 %), чем у гетерозигот (*Sesesu1su1*, от 14 до 25 %) (Lertrat, Pulam, 2007).

Сверхсахарная кукуруза имеет в своем геноме ген *sh2*, локализованный в третьей хромосоме и находящийся в рецессивном состоянии. Оба гена, *su1* и *sh2*, влияют на синтез углеводов в зерне: *su1* блокирует стадию превращения сахаров в крахмал, а *sh2* – синтез крахмала при переходе сахаров в декстрины. При сочетании в одном генотипе *su1* и *sh2* повышается содержание сахаров – до 21–35 %. Зрелые зерновки при этом выглядят щуплыми и морщинистыми (Супрунов и др., 2017). В настоящее время ведущими селекционно-семеноводческими фирмами мира проводятся работы по созданию сортов суперсладкой кукурузы. Суперсладкая кукуруза не является ген-модифицированным продуктом, все ее гибриды получены путем скрещивания растений и селекции по высоким показателям *sh2* (Трасу, 1997).

Селекцией сахарной кукурузы в Российской Федерации занимаются во Всероссийском научно-исследовательском институте кукурузы, Кабардино-Балкарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства (г. Нальчик), Краснодарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства, Научно-производственном объединении «КОС МАИС», Научно-исследовательском институте сельского хозяйства Юго-Востока. По данным Государственной комиссии Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений на 2019 г., в России зарегистрирован 121 сорт сахарной кукурузы, допущенный к использованию (Государственный реестр селекционных достижений, 2019).

В стадии молочно-восковой (технической) спелости зерно сахарной кукурузы имеет очень нежный перикарпий, что особенно ценно при консервировании (Tanaboon, 1995), по наличию основных питательных веществ не уступает таким ценным в пищевом отношении овощным бобовым культурам, как зеленый горошек и спаржевая фасоль, а по содержанию углеводов значительно превосходит их (Hooda, Kawatra, 2013). Очень важно для организации здорового питания, что белок кукурузы обладает гораздо меньшей аллергенной активностью, чем белок пшеницы (Holding, 2014). К тому же, в отличие от других овощных культур, сахарная кукуруза не накапливает нитратов в зерновках, а листовые обертки на початках предохраняют ее зерно от воздушного загрязнения различными веществами, в том числе радионуклидами. Сахарная кукуруза используется также для лечебных целей. Экстракты из части цветков (рылец) кукурузы применяются в официальной и народной медицине при лечении воспалительных заболеваний печени и желчного пузыря (Kumar, Jhariya, 2013).

Для удовлетворения возрастающих запросов производства к качеству зерна важное значение имеет правильный подбор местных сортов и линий для гибридизации. Стародавние (как правило, гетерогенные) сорта – ценный исходный материал для создания самоопыленных линий, что способствует существенному расширению генетической базы родительских форм. Вызревшие зерновки различных местных сортов сахарной кукурузы могут иметь разную окраску: белую (бесцветную), желтую, коричневую, красную, фиолетовую, синюю и др. Селекция на окраску зерна – результат развития нового направления селекции – эстетического (Новоселов, 2007).

Достоинство сортов сахарной кукурузы и интерес к ним пищевой промышленности позволяют рассматривать генетические ресурсы коллекции ВИР в качестве потенциально ценного исходного материала для селекции. Значимость коллекции тем выше, чем полнее информация о каждом сохраняемом в ней образце. В связи с этим выявление дублетных образцов становится актуальным еще и потому, что не потребуются затраты на изучение образцов, определенных как дублетные, равно как и на их поддержание и хранение.

В настоящее время для контроля генетической целостности (подлинности) образцов, определения дублетов и ошибок при репродуцировании наряду с морфологическими признаками привлекаются молекулярные (ДНК и белковые) маркеры (Пюккенен и др., 2005; Конарев, 2006; Поточкина, 2009; Стрельченко, Ковалева, 2009). Для семенного контроля и решения ряда задач селекции

более надежными следует признать запасные белки. Они множественны, наиболее полиморфны и локализованы в морфогенетически однородных тканях – эндосперме зрелого семени (Конарев, 1983). Белковые маркеры дают возможность контролировать биотипный (генотипический) состав популяции сорта (например, установить снижение гетерогенности популяции, которая ведет к ухудшению адаптивных свойств сорта (Конарев и др., 2000; Конарев, 2006). Анализ полиморфизма запасного белка зерна положен в основу международных и отечественных стандартных методов идентификации линий и сортов (Скоке, 1978; Konarev et al., 1987). В нашей работе мы использовали запасные белки кукурузы – зеины, электрофоретические спектры которых служат надежными маркерами в сортовой идентификации и регистрации генофонда кукурузы. Поскольку кукуруза относится к перекрестноопыляемым растениям, зеины характеризуются довольно высоким полиморфизмом и широко привлекаются в изучении генетических ресурсов кукурузы (Сидорова и др., 2012, 2015, 2018). При исследовании специфики сорта по спектрам белков необходим позерновой анализ. Электрофоретический спектр зеина отдельной зерновки маркирует соответствующий ей биотип (генотип).

Целью нашей работы было выявление дублетных образцов в коллекции сахарной кукурузы ВИР им. Н.И. Вавилова. Мы поставили перед собой следующие задачи: установить по электрофоретическим спектрам зеина биотипный состав и полиморфизм местных сортов подвиды сахарной кукурузы из коллекции ВИР, имеющих разную

окраску зерна; осуществить их паспортизацию по белковым спектрам; для некоторых образцов, имеющих одинаковое сортовое название, но разные номера каталогов регистрации, установить степень идентичности их по биотипному составу с целью исключения дублетов.

Материалы и методы

Работу проводили в отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР им. Н.И. Вавилова. Материалом для исследования послужили вызревшие зерновки 19 стародавних местных сортов подвиды сахарной кукурузы с разным цветом зерна (по 50 зерновок каждого образца), репродуцированные на Волгоградской опытной станции ВИР (см. таблицу).

Электрофорез зеина проводили в вертикальных пластинах ПААГ без охлаждения в течение 4.5 ч при напряжении 500–580 В, по стандартной методике ISTA, разработанной с участием отдела биохимии и молекулярной биологии Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. Гелевая пластина содержала 10 % акриламид и 8 М мочевины. Зеин выделяли из единичных зерен раствором, содержащим 6 М мочевины и 0.01 М дитиотрейтол. Окрашенные и высушенные пластины с электрофоретическими спектрами сканировали. Регистрацию электрофоретических спектров зеина проводили по стандарту (самоопыленная линия, название – F2, происхождение – Франция). Номера белковых компонентов соответствуют величинам их электрофоретической подвижности.

Образцы, использованные в работе

Номер по каталогу ВИР	Сорт	Цвет зерна	Происхождение, год поступления в коллекцию	Год репродукции
к-30	Black Mexican	Синий	США, Нью-Йорк, 1921	2013
к-95	Black Mexican		США, Лос-Анджелес, 1921	
к-898	Black Mexican		США, Калифорния, 1921	2001
к-13817	Black Mexican		Канада, Монреаль, 1959	2005
к-1578	Local blue		Китай, Маньчжурия, 1924	2006
к-4655	Burpee's Early Earliest Catawba 302	Фиолетово-синий	США, Филадельфия, 1927	2005
к-893	Pickaninny	Синий	Канада, Оттава, 1922	
к-10999	Pickaninny	Серо-синий	США, Висконсин, 1947	
к-20870	Local	Синий	Венгрия, Будапешт, 1983	1999
к-83	Early June	Белый	США, Сакраменто, 1921	2013
к-115	White Ever green		США, Нью-Йорк, 1921	
к-127	Oregon Evergreen		США, Лос-Анджелес, 1921	
к-143	Early Mayflower		США, Коннектикут, 1921	
к-29	Golden Bantam	Желтый	США, Нью-Йорк, 1921	
к-69	Golden Bantam		США, Нью-Йорк, 1921	
к-146	Golden Bantam		Канада, Манитоба, 1921	
к-5811	Marshall's Earliest	Оранжево-красный	США, Нью-Йорк, 1930	2002
к-5842	Early Dawn	Темно-красный	США, Коннектикут, 1930	2005
к-10998	Nuetta	Красный	США, Висконсин, 1947	

Результаты и обсуждение

Электрофоретические спектры зеина четырех образцов сорта Black Mexican подвида сахарной кукурузы с синей окраской зерна, зарегистрированных в коллекции в разные годы под разными номерами каталогов, представлены на рис. 1. В спектрах биотипов 3, 4 и 5 (с частотой встречаемости по 15 %) отсутствует комбинация компонентов 52–67. Между собой они различаются по компонентам 40, 47 и 63. Биотип 6 встречается редко (10 %), в его спектрах отсутствуют комбинации компонентов 38–57 и 52–67.

У одноименного сорта с номером каталога к-95 обнаружено пять биотипов зеина. У него нет основного типа спектра. По биотипу 1 образцы к-30 и к-95 идентичны и имеют одинаковую встречаемость (35 %). Биотип 2 образца к-95 отличается от биотипа 2 образца к-30 только отсутствием в его спектрах компонента 37 и большей частотой встречаемости (25 %). Биотипы 3 и 4 (к-95) имеют иные по составу типы спектров, которые в образце к-30 не наблюдаются. Биотип 5 отмечается редко (10 %), он идентичен по составу и частоте встречаемости биотипу 6 образца к-30. На основании изложенного выше образцы к-30 и к-95 можно отнести к генетически близким (по наличию часто встречаемого биотипа 1), но при этом они не являются дублетами.

Образцы к-13817 и к-898, в отличие от образцов к-30 и к-95, имеют иные по составу типы спектров зеина. Они показывают низкий внутрисортный полиморфизм (четыре и два биотипа соответственно). В их спектрах нет комбинации компонентов 52–67, которая обязательно присутствует в спектрах часто встречаемых биотипов у образцов к-30 и к-95. Биотипы 2, 3 и 4 образца к-13817 (суммарная частота встречаемости 55 %) и биотип 1 образца к-898 (60 %) в спектрах не имеют комбинации компонентов 38–57. Такой биотип в образцах к-30 и к-95 наблюдается редко (10 %). В спектрах часто встречаемого биотипа 1 образца к-13817 (45 %) и биотипа 2 образца к-898 присутствует комбинация компонентов 38–57 (40 %). Однако по этому биотипу они не идентичны, так как у образца к-13817 интенсивность комбинации компонентов 38–57 выше, чем у образца к-898; в спектрах рассматриваемых образцов присутствуют дополнительные компоненты. У образцов к-30 и к-95 такие типы спектров не отмечены.

Все проанализированные образцы с одинаковым сортовым названием имеют различные по компонентному составу типы спектров зеина, что свидетельствует о необходимости их хранения под разными каталожными номерами. Электрофоретические спектры зеина двух образцов подвида сахарной кукурузы с синим цветом зерна сорта Pikaninny, зарегистрированных в коллекции под разными номерами каталогов, к-10999 и к-893, продемонстрированы на рис. 2. Образец к-10999 характеризуется значительным внутрисортным полиморфизмом. Обнаружено шесть типов спектров зеина с различной частотой встречаемости. Чаще других наблюдается биотип 1 (30 %). В его спектрах отсутствуют комбинации компонентов 38–57 и 52–67. Биотип 2 бывает редко (10 %), он идентичен биотипу 1 по наличию в спектрах интенсивных компонентов 46, 50 и 55, а отличается от него отсутствием в спектрах компонентов 40 и 63, а также дополнительным компонентом 70. В спектрах остальных

биотипов (3–6) присутствует комбинация компонентов 38–57. Из них только биотип 3 имеет в спектрах комбинации компонентов 52–67 (20 %). Для спектров остальных биотипов (4–6) характерно наличие–отсутствие ряда слабых по интенсивности компонентов. Стародавний образец к-893 сорта Pikaninny отличается от к-10999 низким внутрисортным полиморфизмом. У него установлено всего три биотипа. Частота встречаемости основного биотипа 1 составляет 80 %. По спектру зеина он идентичен биотипу 1 образца к-10999 (30 %). В его спектрах отсутствует комбинация компонентов 38–57. Биотип 2 отмечен реже (15 %), по наличию в спектрах интенсивных компонентов он идентичен биотипу 1, но отличается от него присутствием дополнительных компонентов слабой интенсивности. Основные биотипы 1 и 2 образца к-893 идентичны по основным типам спектров 1 и 2 образца к-10999. Биотип 3 наблюдается крайне редко (5 %). В образце к-10999 такой тип спектра не отмечен.

Проанализированные образцы с одинаковым сортовым названием имеют разные по компонентному составу типы спектров зеина, и, следовательно, не принадлежат одному образцу. Спектры зеина трех образцов с одинаковым сортовым названием, Golden Bantam, подвида сахарной кукурузы с желтой окраской зерна представлены на рис. 3. Стародавний образец к-146 показал значительный внутрисортный полиморфизм. У него установлено шесть типов спектров. Все биотипы характеризует наличие в их спектрах комбинации компонентов 52–67 разной степени интенсивности. Четыре из них (1–4) имеют также комбинацию компонентов 38–57. Биотипы 5 и 6 отмечаются отсутствием в их спектрах комбинации компонентов 38–57. Биотипы с высокой частотой встречаемости 1 и 2 характеризуются отсутствием в их спектрах компонентов 40 и 63, которые в спектрах редких биотипов (5 и 6) весьма интенсивны. Биотипы 1–4 имеют разное сочетание компонентов 47, 48 и 50. Компонент 50 отсутствует в спектрах биотипов 1 и 2.

Образец к-69 выделяется низким внутрисортным полиморфизмом. У него выявлено три биотипа, частота встречаемости которых составляет 28–36 %. По типам спектров образец к-69 близок биотипам 1, 2 и 3 образца к-146. Биотипы 4, 5 и 6 сорта к-146 имеют иные по составу типы спектров, которых нет в образце к-69.

Третий образец из группы Golden Bantam, к-29, характеризуется высоким внутрисортным полиморфизмом, установлено шесть биотипов. Наиболее часто отмечается биотип 1 (30 %), частота встречаемости остальных биотипов примерно одинакова и составляет 12–16 %. Только два биотипа, 3 и 4, по типам спектров идентичны биотипам 2 и 3 образца к-146. Биотипов 1, 2, 5 и 6 к-29 в одноименных образцах к-146 и к-69 нет, так как у них в спектрах отсутствует комбинация компонентов 52–67, характерная для всех типов спектров образцов к-146 и к-69.

Изученные стародавние образцы с одинаковым сортовым названием имеют различные по компонентному составу типы спектров зеина, следовательно, они не являются дублетами.

Электрофоретические спектры зеина трех местных сортов подвида сахарной кукурузы с красной окраской

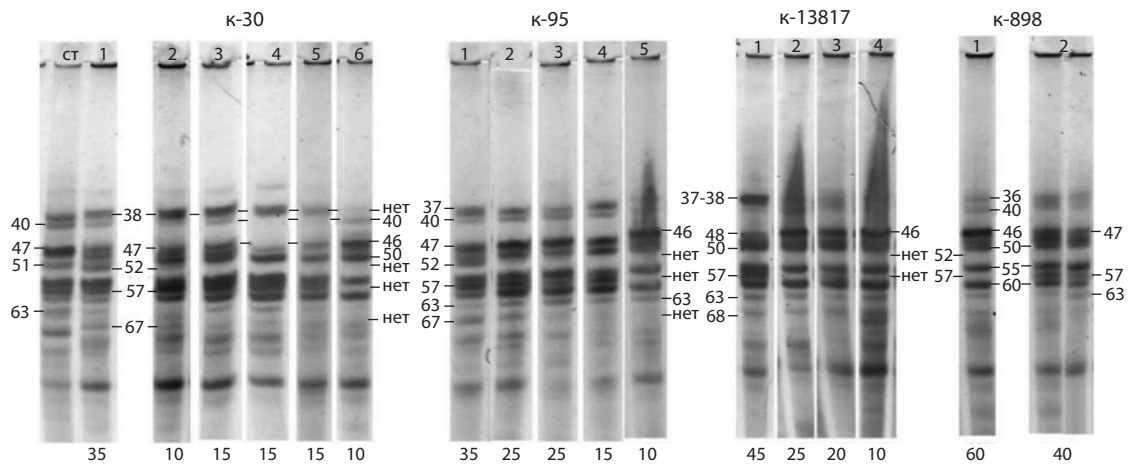


Рис. 1. Электрофореграммы зеина образцов подвида сахарной кукурузы с синей окраской зерна сорта Black Mexican: к-30, к-95, к-13817 и к-898.

Здесь и на рис. 2-6: цифры над спектрами обозначают номера биотипов; вдоль спектров – номера полипептидов в спектре; под спектрами – частоты встречаемости каждого биотипа.

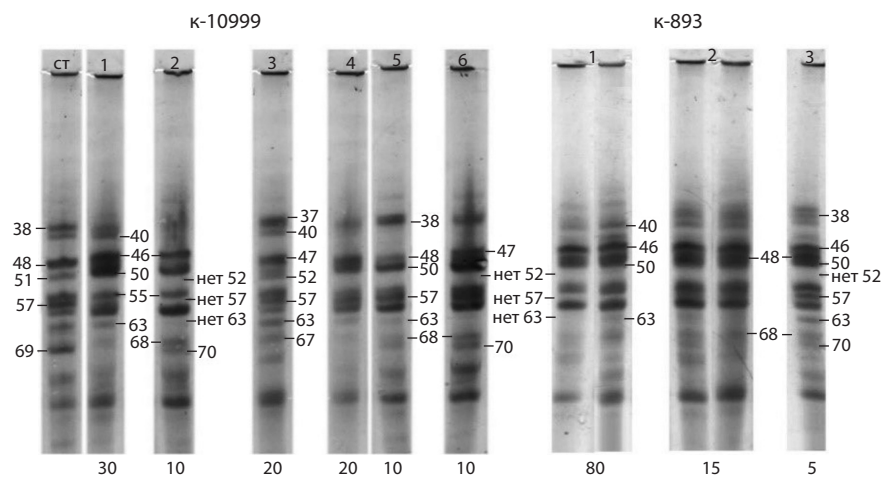


Рис. 2. Электрофореграммы зеина образцов подвида сахарной кукурузы с синей окраской зерна сорта Pickaninny: к-10999 и к-893.

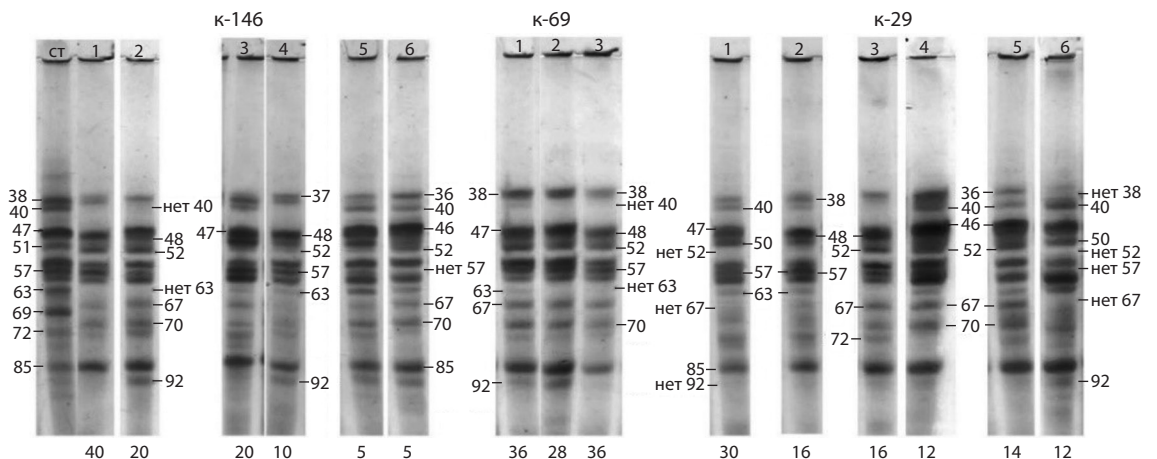


Рис. 3. Электрофореграммы зеина образцов подвида сахарной кукурузы с желтой окраской зерна сорта Golden Bantam: к-146, к-69 и к-29.

зерна продемонстрированы на рис. 4. Изученные образцы имеют специфичные для каждого сорта типы спектров зеина.

У сорта к-5842 отмечен основной тип спектра (биотип 1) с частотой встречаемости 75 % и два редких, биотипы 3 и 4. Биотип 2 (15 %) отличается от биотипа 1 отсутствием в спектрах компонента 40. Характерным для этого сорта оказалось присутствие интенсивного компонента 63 и комбинации компонентов 38–57, которые имеются в спектрах всех биотипов. Специфично для него также отсутствие в спектрах комбинации компонентов 52–67.

Сорт к-10998 обладает большим внутрисортным полиморфизмом. Для него не выявлен основной тип спектра зеина. Чаще других наблюдаются биотип 1 с частотой встречаемости 35 %, биотипы 2 и 3 (25 и 22 % соответственно). Для этого сорта характерно отсутствие в спектрах всех биотипов компонента 63. Это отличает его от местных сортов к-5842 и к-5811 и увеличивает вероятность получения хорошей гибридной комбинации с красной окраской зерна.

Сорту к-5811 присущ низкий внутрисортный полиморфизм. Обнаружены основной тип спектра (биотип 1) с частотой встречаемости 75 % и три биотипа с низкой частотой встречаемости (от 5 до 10 %). Характерными для него оказались отсутствие в спектрах основного биотипа сразу двух комбинаций компонентов, 38–57 и 52–67, а также наличие в спектрах всех биотипов компонентов 40 и 63.

Установлено, что все изученные сорта с красной окраской зерна имеют маркерные компоненты, по которым их можно идентифицировать, создать новые гибриды и на их основе отселектировать новые линии.

Спектры зеина четырех сортов подвита сахарной кукурузы с белой (бесцветной) окраской зерна показаны на рис. 5. Изученные образцы имеют специфичные для каждого образца типы спектров. Два сорта, к-143 и к-115, обладают значительным внутрисортным полиморфизмом. Они имеют по пять типов спектров с различной частотой встречаемости. Чем выше полиморфизм сортов, тем сложнее определить у них основной тип спектра. Однако у сорта к-143 чаще других отмечаются биотипы 1 и 2 (по 35 % каждый). Они имеют идентичные типы спектров и отличаются друг от друга интенсивностью проявления отдельных компонентов. Биотипы 1 и 2 можно считать основными типами спектров для образца к-143. Биотип 3 (20 %) отличается от первых двух типов отсутствием в спектрах компонента 40. Биотипы 4 и 5, которые наблюдаются редко, имеют иные по составу спектры зеина. В спектрах биотипа 4 интенсивно проявляется комбинация компонентов 52–67, отсутствующая в спектрах остальных биотипов. В спектрах биотипа 5 нет комбинации компонентов 38–57, специфичной для всех биотипов этого сорта.

У сорта к-115 чаще других отмечается биотип 1 (35 %). Тип спектра этого биотипа уникален для этого образца, так как не идентичен по компонентному составу другим часто встречающимся биотипам, 2 и 3 (по 25 % каждый), и еще более редким биотипам, 4 и 5 (10 и 5 % соответственно). Для этого сорта свойственна низкая интенсивность проявления зоны компонентов 36–40.

У сорта к-83 чаще других присутствуют биотипы 1 и 2 (40 и 30 % соответственно). В спектрах биотипов 1 и 2 проявляется комбинация компонентов 52–67, но в биотипе 2 она слабой интенсивности. В спектрах биотипа 2 комбинация компонентов 38–57 выражена интенсивно, тогда как в спектрах биотипов 1 и 3 ее нет. В спектрах редкого биотипа 4 отсутствует компонент 63, который специфичен для спектров этого сорта.

Сорту к-127 присущ низкий полиморфизм. Обнаружены основной биотип 1 с частотой встречаемости 65 %, а также биотипы 2 и 3 (25 и 10 %). Сорт к-127 – уникальный среди всех изученных нами сортов подвита сахарной кукурузы. В его спектрах присутствует специфичный компонент 64. Характерным для сорта оказалось также отсутствие в спектрах всех биотипов комбинации компонентов 52–67. В связи с этим этот сорт с большой долей вероятности может быть успешно использован в качестве улучшающего при создании новых гибридов.

Электрофоретические спектры зеина трех сортов подвита сахарной кукурузы с синей окраской зерна представлены на рис. 6. Все образцы – разные по названию и номеру каталога, среди них нет низкополиморфных сортов. У них не идентифицирован основной тип спектра, частота встречаемости которого составляла бы больше 50 %. Однако у сортов к-20870, к-1578 и к-4655 наиболее часто встречаемый биотип составляет 50 %. Изученные сорта имеют маркерные типы спектров. Для сорта к-1578 характерно наличие в спектрах биотипа 1 комбинаций компонентов 38–57 и 52–67, а также компонентов 40 и 63. У биотипа 2, в отличие от биотипа 1, комбинация компонентов 52–67 и компонент 40 имеют слабую интенсивность. Отличительная особенность биотипа 2 – присутствие в спектрах интенсивных компонентов 37 и 50. В спектрах биотипа 3 отсутствуют комбинация компонентов 52–67 и компоненты 37 и 47. Этот биотип отмечается реже остальных (20 %). Маркерными для этого сорта являются комбинация компонентов 38–57, а также компоненты 40 и 63.

У сорта к-20870 обнаружено три биотипа. Чаще других наблюдается биотип 1 (50 %). В спектрах этого биотипа присутствуют интенсивная комбинация компонентов 38–57, а также интенсивные компоненты 37 и 47. Компоненты 40 и 63 обладают слабой интенсивностью. Биотип 2 с частотой встречаемости 20 % отличается от биотипа 1 лишь интенсивным компонентом 48 и слабой интенсивностью компонентов 37, 40 и 63, а также отсутствием компонента 47. В спектрах биотипа 3 с частотой встречаемости 30 %, в отличие от биотипов 1 и 2, интенсивно проявляется комбинация компонентов 52–67, а также компонентов 40 и 47. Для этого сорта специфичны наличие в спектрах всех биотипов интенсивной комбинации компонентов 38–57 и отсутствие или очень слабая интенсивность компонента 63.

У сорта к-4655 установлено три биотипа. Чаще других присутствует биотип 1 с частотой встречаемости 50 %. В спектрах зеина биотипа 1 хорошо проявляется комбинация компонентов 38–57. В некоторых спектрах эта комбинация, а также компонент 63 могут иметь слабую интенсивность. Биотип 2 отличается от биотипа 1 меньшей частотой встречаемости (25 %). В спектрах этого

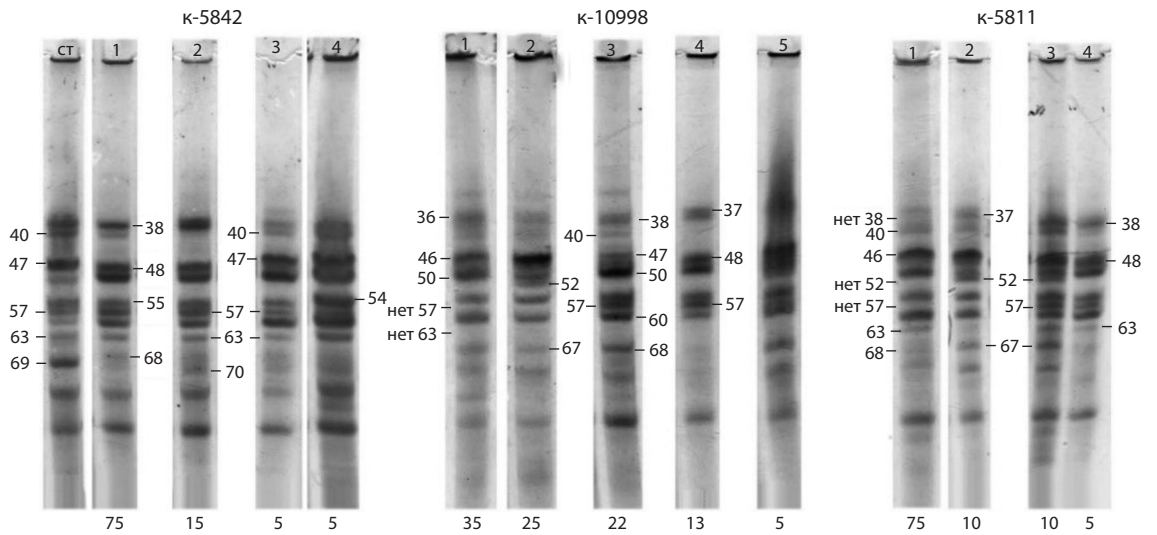


Рис. 4. Электрофореграммы зеина сортов подвиды сахарной кукурузы с красной окраской зерна: к-5842, к-10998 и к-5811.

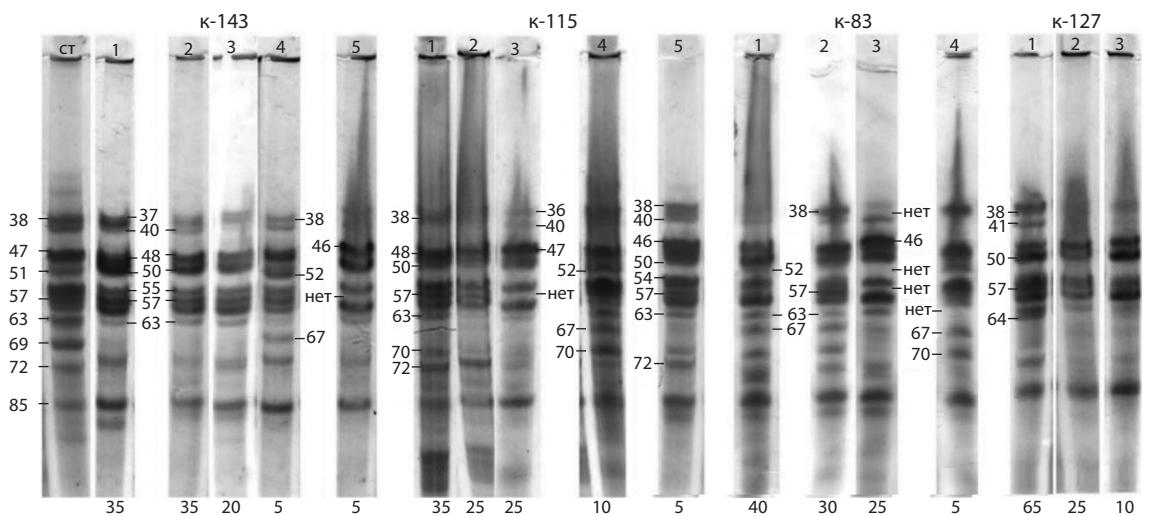


Рис. 5. Электрофореграммы зеина сортов подвиды сахарной кукурузы с белой окраской зерна: к-143, к-115, к-83 и к-127.

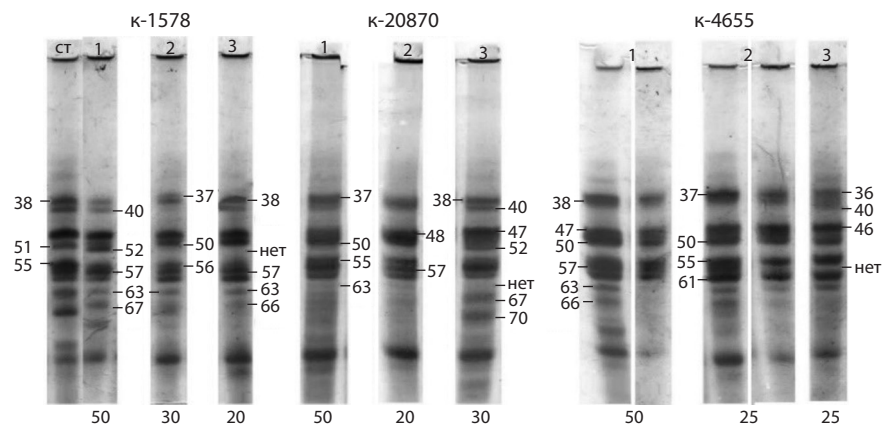


Рис. 6. Электрофореграммы зеина сортов подвиды сахарной кукурузы с синей окраской зерна: к-1578, к-20870 и к-4655.

биотипа присутствуют интенсивные компоненты 37 и 46, отсутствующие в спектрах биотипа 1. В спектрах биотипа 2 комбинация 38–57 имеет слабую интенсивность.

Биотип 3 (25%), по сравнению с биотипами 1 и 2, имеет иные по составу типы спектров. В спектрах биотипа 3 отсутствует комбинация компонентов 38–57. В отличие от биотипов 1 и 2, в спектрах присутствуют интенсивные компоненты 36 и 40. Для сорта характерно отсутствие комбинации компонентов 52–67, типичной для других сортов сахарной кукурузы.

Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что среди образцов с синей окраской зерна и одинаковым названием сорта, Black Mexican, два образца, к-30 и к-95, можно отнести к генетически близким сортам, но при этом они не являются дублетами. Два других образца, к-13817 и к-898, в отличие от к-30 и к-95, имеют низкий полиморфизм и иные по составу типы спектров. Два образца с синей окраской зерна и одноименным названием сортов, Pikanipnu, имеют разные номера каталогов, к-10999 и к-893, и также не являются дублетами. Образец к-10999 отличается значительным полиморфизмом и имеет шесть биотипов. Образец к-893 имеет низкий внутрисортной полиморфизм (три биотипа), у него отсутствует значительное число биотипов, характерных для образца к-10999. Среди одноименных сортов с желтой окраской зерна Golden Bantam (к-146, к-69 и к-29) также не обнаружено дублетов. Образцы к-146 и к-29 обладают высоким внутрисортным полиморфизмом и имеют разные по составу типы спектров. Образец к-69 имеет низкий внутрисортной полиморфизм. Трех биотипов, присутствующих в к-146 и к-29, в образце к-69 нет. Проанализированные образцы с одинаковыми сортовыми названиями имеют разные по компонентному составу спектры зеина, что свидетельствует о значимой разнице между ними и невозможности их объединения.

Изучены три стародавних местных сорта подвита сахарной кукурузы с красной окраской зерновок. Для каждого сорта определены специфичные компоненты. Два сорта, к-143 и к-115, подвита сахарной кукурузы с белой окраской зерна показывают значительный внутрисортной полиморфизм. Для них идентифицированы специфичные компоненты. Сорт к-127 присущ низкий полиморфизм. Он уникален присутствием в его спектрах компонента 64. Три сорта подвита сахарной кукурузы с синей окраской зерна, к-20870, к-1578 и к-4655, высокополиморфны и имеют специфичные для каждого сорта типы спектров.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о перспективности использования электрофореза зеина для идентификации, регистрации и выявления дублетных образцов в коллекции сортов подвита сахарной кукурузы с разной окраской зерновок.

Список литературы / References

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. 2019. <http://reestr.gossort.com>.

[State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. 2019. Available at: <http://reestr.gossort.com> (in Russian)]

Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. Систематика, география, цитогенетика, экология, происхождение, использование. Л.: Колос, 1971.

[Zhukovsky P.M. Cultivated Plants and their Relatives: Systematics, Geography, Cytogenetics, Ecology, Origin, Use. Leningrad: Kolos Publ., 1971. (in Russian)]

Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции. *Аграр. Россия*. 2006;6:4-22.

[Konarev A.V. The use of molecular markers for solving problems of plant genetic resources and plant breeding. *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2006;6:4-22. (in Russian)]

Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства. *Цитология и генетика*. 2000;34(2):91-104.

[Konarev A.V., Konarev V.G., Gubareva N.K., Peneva T.I. Seed proteins as markers in solving the problems of genetic resources of plant breeding and seed production. *Tsitologiya i Genetika = Cytology and Genetics*. 2000;34(2):91-104. (in Russian)]

Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983.

[Konarev V.G. Plant Proteins as Genetic Markers. Moscow: Kolos Publ., 1983. (in Russian)]

Новоселов С.Н. Сахарная кукуруза: история, селекция, экономика. Пятигорск: РИА-КМВ, 2007.

[Novoselov S.N. Sugar Corn: History, Selection, Economics. Pyatigorsk: RIA-KMV Publ., 2007. (in Russian)]

Потокина Е.К. Использование молекулярных маркеров в селекции ячменя. Генетические ресурсы ржи, ячменя и овса. *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 2009;165:36-39.

[Potokina E.K. The use of molecular markers in barley breeding. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2009;165:36-39. (in Russian)]

Пюккенен В.П., Губарева Н.К., Митрофанова О.П. Поиск возможных дублетов среди коллекционных образцов мягкой пшеницы из Китая. *Аграр. Россия*. 2005;2:31-35.

[Pukkenen V.P., Gubareva N.K., Mitrofanova O.P. Searching for possible duplicates among the collection accessions of bread wheat from China. *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2005;2:31-35. (in Russian)]

Сидорова В.В., Керв Ю.А., Матвеева Г.В., Конарев А.В. Перспективы использования зеиновых маркеров в селекции линий и сортов восковидного подвита кукурузы. *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 2018;179(3):240-249. DOI 10.30901/2227-8834-2018-3-240-249.

[Sidorova V.V., Kerv Yu.A., Matveeva G.V., Konarev A.V. Prospects of using zein markers in breeding waxy maize lines and varieties. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2018;179(3):240-249. DOI 10.30901/2227-8834-2018-3-240-249. (in Russian)]

Сидорова В.В., Конарев А.В., Керв Ю.А., Матвеева Г.В. Белковые маркеры в анализе генетического разнообразия, селекции и семенном контроле кукурузы. *Аграр. Россия*. 2015;12:2-10. DOI 10.30906/1999-5636-2015-12-2-10.

[Sidorova V.V., Konarev A.V., Kerv Yu.A., Matveeva G.V. Protein markers in the analysis of a genetic variety, selections, and the corn seed control. *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2015;12:2-10. DOI 10.30906/1999-5636-2015-12-2-10. (in Russian)]

Сидорова В.В., Матвеева Г.В., Конарев А.В., Керв Ю.А., Кудрявцев А.М., Упельник В.П., Янковский Н.К. Зеиновые маркеры в анализе генофонда кукурузы и повышении эффективности селекционно-генетических программ. *Аграр. Россия*. 2012;7:5-11.

- [Sidorova V.V., Matveeva G.V., Konarev A.V., Kerv Yu.A., Kudryavtsev A.M., Upelnik V.P., Yankovsky N.K. Zein markers in maize gene pool analysis and breeding improvement. *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2012;7:5-11. (in Russian)]
- Стрельченко П.П., Ковалева О.Н. Классификация генетического разнообразия культурного ячменя коллекции ВИР с использованием ПДРФ-маркеров. *Тр. по прикл. бот., ген. и селекции*. 2009; 165:47-50.
- [Strelchenko P.P., Kovaleva O.N. Genetic diversity of cultivated barley from the VIR collection using RFLP markers. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2009;165:47-50. (in Russian)]
- Супрунов А.И., Терещенко А.А., Парпуренко Н.В., Слащев А.Ю. Эндоспермовые мутации кукурузы – доноры признаков качества зерна. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*. 2017;1:45-46.
- [Suprunov A.I., Tereshchenko A.A., Parpurenko N.V., Slashev A.Yu. The endosperm corn mutations is the donors of grain quality characteristics. *Vestnik Rossiyskoy Selskokhozyaystvennoy Nauki = Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2017;(1):45-46. (in Russian)]
- Шмараев Г.Е. Генофонд и селекция кукурузы. Теоретические основы селекции. СПб.: ВИР, 1999;4:384.
- [Schmaraev G.E. The Gene Pool and Breeding of Maize. Theoretical Basis of Plant Breeding. St. Petersburg: VIR, 1999;4:384. (in Russian)]
- Cooke R.J. The standartization of electrophoresis methods for variety identification. In: *Biochemical Identification of Varieties: Materials III International Symposium ISTA. USSR. Leningrad: VIR, 1978; 14-27.*
- Holding D.R. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. *Front. Plant Sci.* 2014;5(276):1-9. DOI 10.3389/fpls.2014.00276.
- Hooda S., Kawatra A. Nutritional evaluation of baby corn (*Zea mays*). *Nutr. Food Sci.* 2013;43(1):68-73. DOI 10.1108/00346651311295932.
- Konarev A.V., Gavriljuk I.P., Gubareva N.K. Storage proteins in the identification of species, cultivars and lines. *Seed Sci. Technol. ISTA*. 1987;15(3):675-678.
- Kumar D., Jhariya N.A. Nutritional, medicinal and economical importance of corn. *Res. J. Pharm. Sci.* 2013;2(7):7-8.
- Lertrat K., Pulam T. Breeding for increased sweatness in sweet corn. *Int. J. Plant Breed.* 2007;1(1):27-30.
- Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M., Sanchez G.J., Buckler E., Doebley J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99(9): 6080-6084. DOI 10.1073/pnas.052125199.
- Piperno D.R., Flannery K.V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98(4):2101-2103. DOI 10.1073/pnas.98.4.2101.
- Tanaboon S. Effect of sweet corn varieties and thermal processing on quality of canned whole corn kernel. *Kasetsart Journal – Natural Science*. 1995;29(1):64-76.
- Tracy W.F. History, genetics, and breeding of supersweet (shrunken-2) sweet corn. *Plant Breed. Rev.* 1997;(14):189-236. DOI 10.1002/9780470650073.ch7.
- Wu Y., Messing J. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value. *Front. Plant Sci.* 2014;5(240):1-5. DOI 10.3389/fpls.2014.00240.

ORCID ID

V.V. Sidorova orcid.org/0000-0002-5233-8949
Yu.A. Kerv orcid.org/0000-0002-3728-6968
A.V. Konarev orcid.org/0000-0003-2938-1014


Благодарности. Исследования выполнены в рамках государственного задания № 0662-2019-006.

Авторы выражают глубокую благодарность бывшему куратору коллекции кукурузы отдела крупных культур ВИР им. Н.И. Вавилова канд. с.-х. наук Г.В. Матвеевой за предоставленный ценный коллекционный материал и помощь в работе.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.08.2019. После доработки 26.06.2020. Принята к публикации 06.07.2020.

Сравнительный анализ экспрессии генов у чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) при низкотемпературном стрессе

Л.С. Самарина , А.О. Мацькив, Н.Г. Конинская, Т.А. Симонян, В.И. Маляровская, Л.С. Малюкова

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», Сочи, Россия

 e-mail: q11111w2006@yandex.ru


Аннотация. Низкотемпературный стресс – один из главных факторов, ограничивающих распространение и снижающих урожайность многих субтропических культур, в том числе и чая. Для эффективной селекции чая на устойчивость к морозу необходимо выявить генетические особенности ответа на холод у устойчивых генотипов и найти маркеры для определения доноров устойчивости в коллекциях. В настоящей работе проведен сравнительный анализ экспрессии 18 генов (*ICE1*, *CBF1*, *DHN1*, *DHN2*, *DHN3*, *NAC17*, *NAC26*, *NAC30*, *bHLH7*, *bHLH43*, *P5CS*, *WRKY2*, *LOX1*, *LOX6*, *LOX7*, *SnRK1.1*, *SnRK1.2*, *SnRK1.3*), вовлеченных в абиотический стрессовый ответ у двух контрастных по устойчивости генотипов чая в условиях холода и мороза. Низкотемпературный стресс индуцировали путем помещения растений в холодильные камеры и снижением температуры до 0...+2 °С на семь дней (холодовой стресс) с последующим снижением температуры до -4...-6 °С на пять дней (промораживание). Кондуктометрическим методом измеряли электропроводность тканей листа, в результате чего были подтверждены различия по признаку устойчивости у двух исследуемых генотипов чая: холодное воздействие не приводило к изменению электропроводности тканей листа, но после промораживания этот показатель возрастал в большей степени у неустойчивого генотипа. Методом qRT-PCR анализировали относительный уровень экспрессии генов на фоне референсного гена актина. При индукции стресса показана повышенная экспрессия всех исследуемых генов. У устойчивого генотипа чая выявлен ряд генов, более активно экспрессирующихся по сравнению с неустойчивым генотипом: *ICE1*, *CBF1*, *DHN2*, *NAC17*, *NAC26*, *bHLH43*, *WRKY2*, *P5CS*, *LOX6*, *SnRK1.1*, *SnRK1.3*. Эти гены могут быть маркерами устойчивости для поиска доноров в коллекциях геноресурсов. Показано, что у устойчивого генотипа чая экспрессия генов холодного ответа начинается уже на стадии акклиматизации. Для дальнейших исследований комплексной устойчивости растений к низкотемпературному стрессу актуальным является изучение экспрессии этих генов в других органах чайного растения (побегах, корнях) при разной силе низкотемпературного воздействия. Ключевые слова: *Camellia sinensis*; экспрессия генов; морозоустойчивость; транскрипционные факторы; протеинкиназы; липоксигеназы.

Для цитирования: Самарина Л.С., Мацькив А.О., Конинская Н.Г., Симонян Т.А., Маляровская В.И., Малюкова Л.С. Сравнительный анализ экспрессии генов у чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) при низкотемпературном стрессе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):598-604. DOI 10.18699/VJ20.653

Comparative analysis of gene expression in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) under low-temperature stress

L.S. Samarina , A.O. Matskiv, N.G. Koninskaya, T.A. Simonyan, V.I. Malyarovskaya, L.S. Malyukova

Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Sochi, Russia

 e-mail: q11111w2006@yandex.ru

Abstract. Low-temperature stress is one of the main factors limiting the distribution and reducing the yield of many subtropical crops, including the tea crop. Efficient breeding to develop frost-tolerant cultivars requires a reliable set of genetic markers for identifying resistance donors, and that is why it is necessary to reveal the specific genetic response in frost-tolerant genotypes in comparison with frost-susceptible ones. In this work, we performed a comparative analysis of the expression of 18 tea genes (*ICE1*, *CBF1*, *DHN1*, *DHN2*, *DHN3*, *NAC17*, *NAC26*, *NAC30*, *bHLH7*, *bHLH43*, *P5CS*, *WRKY2*, *LOX1*, *LOX6*, *LOX7*, *SnRK1.1*, *SnRK1.2*, *SnRK1.3*) under cold and frost conditions in two tea genotypes, tolerant and susceptible. Low-temperature stress was induced by placing the potted plants in cold chambers and lowering the temperature to 0...+2 °C for 7 days (cold stress), followed by a decrease in temperature to -4...-6 °C for 5 days (frost stress). Relative electrical conductivity of leaf was measured in response to the stress treatments, and a significant difference in the frost tolerance of the two tea genotypes was confirmed. Cold exposure did not lead to a change in the electrical conductivity of leaf tissue. On the other hand, frost treatment resulted in increased REC in both genotypes and to a greater extent in the susceptible genotype. Increased expression of all the genes was shown during cold and frost. The genes that were strongly expressed in the tolerant tea genotype were revealed: *ICE1*, *CBF1*, *DHN2*, *NAC17*, *NAC26*, *bHLH43*, *WRKY2*, *P5CS*, *LOX6*, *SnRK1.1*, *SnRK1.3*. These genes can be proposed as markers for the selection of frost-tolerance donors in tea germplasm collections. Additionally, it was

shown that the tolerant genotype is characterized by an earlier response to stress at the stage of cold acclimation. The study of the expression of the identified genes in different organs of tea plants and in different exposures to low temperature is relevant for further investigations.

Key words: *Camellia sinensis*; gene expression; frost tolerance; transcription factors; protein kinases; lipoxygenases.

For citation: Samarina L.S., Matskiv A.O., Koninskaya N.G., Simonyan T.A., Malyarovskaya V.I., Malyukova L.S. Comparative analysis of gene expression in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) under low-temperature stress. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):598-604. DOI 10.18699/VJ20.653 (in Russian)

Введение

Низкотемпературный стресс, мороз (<0 °C) и холод (0...+10 °C), ограничивает ареал распространения многих теплолюбивых культур, в том числе и чая. Перестройка метаболизма в ответ на этот абиотический стресс, включающая накопление антиоксидантов и осмолитов для повышения устойчивости, происходит путем запуска сложных сигнальных путей (Dubouzet et al., 2003). Регуляция этих путей осуществляется основными регуляторными генами: *COR* (cold-responsive). К ним относят гены-регуляторы холодового ответа *ICE* (inducer of *CBF* expression), *CBF* (C-repeat-binding factor) и их мишени: *KIN* (cold-induced), *LTI* (low temperature induced) и *RD* (responsive to dehydration) (Morsy et al., 2005). Продукты этих генов классифицируют на две группы: первая включает гены метаболизма семейств белков, *LEA* (late embryogenesis abundant proteins), *HSP* (heat shock proteins), антифриз-белков, белков метаболизма липидов (*LOX*), дегидринов (*DHN*) и осморегуляторов – сахаров, свободных стеролов, раффинозы, глюкозидов, аминокислот; вторая – транскрипционные факторы, регулирующие передачу сигналов и экспрессию генов ответа на холод (Megha et al., 2018).

Различные по устойчивости к этому фактору культуры характеризуются разнообразными механизмами устойчивости, а у древесных культур, таких как чай (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), ответ на стресс более сложный и комплексный (Hao et al., 2018). Для чайного растения, основная зона произрастания которого – тропические и субтропические регионы, актуальным является создание морозоустойчивых сортов, позволяющих значительно расширить его ареал и увеличить площади возделывания. Северо-Западный Кавказ – один из самых северных регионов промышленного выращивания чая в мире. Доместикация чайного растения в этом регионе длилась около 150 лет, в течение которых плантации распространились из района Озургетти в Грузии (41°55'27" N, 41°59'24" E) на север до Майкопа (44°36'40" N, 40°06'40" E). Поэтому коллекции гермоплазмы чая на Кавказе могут быть источником генотипов с повышенной морозоустойчивостью.

Ранее было показано, что у чайного растения гены *CsICE1* и *CsCBF1* – главные *COR*-гены ответа и адаптации к низкотемпературному стрессу (Wang et al., 2012; Yuan et al., 2013). Были сообщения также, что экспрессия *COR*-генов регулируется как *CBF*-опосредованным АБК-независимым путем, так и *bZIP*-опосредованным АБК-зависимым путем (Ban et al., 2017). Множество транскрипционных факторов (*DHN*, *WRKY*, *HD-Zip*, *NAC*, *bHLH* и др.) и генов синтеза метаболитов запускаются в ответ на холод (Yue et al., 2015; Wang et al., 2016a, b; Chen

et al., 2018; Cui et al., 2018; Shen et al., 2018; Zhu et al., 2018). Об этих и других генах нами был сделан детальный обзор последних публикаций (Самарина и др., 2019). Цель настоящей работы – провести сравнительный анализ экспрессии генов, вовлеченных в абиотический стрессовый ответ у чая, в условиях холода и мороза у кавказских генотипов, произрастающих в одном из самых северных регионов промышленного выращивания чая в мире.

Материалы и методы

Растительный материал и условия эксперимента.

Объектом исследования были трехлетние вегетативно размноженные горшечные растения чая двух контрастных по устойчивости генотипов (коллекции чая Федерального исследовательского центра «Субтропический научный центр Российской академии наук» (ФИЦ ШЦ РАН)): устойчивой к морозу формы А-2016, произрастающей в полевой коллекции Майкопского филиала ФИЦ ШЦ РАН и неустойчивой к морозу сорта Колхида полевой коллекции ФИЦ ШЦ РАН (Сочи) (Туов, Рындин, 2011; Гвасалия, 2015). Горшечные растения (рис. 1) в количестве 10 шт. каждого генотипа выращивали в объеме 2 л бурой кислой лесной почвы (рН_{H₂O} = 5.0). До индукции низкотемпературного воздействия растения в течение месяца находились в лабораторных условиях при температуре 20 ± 2 °C с оптимальным режимом полива и освещением лампами дневного света, фотопериодом 16/8 с интенсивностью освещения 3000 лк. После этого у них брали листья для анализа (контрольная группа). Затем эти растения помещали в холодовые камеры. Индукцию стресса проводили воздействием температурой до 0...+2 °C в течение семи дней (холодовой стресс) с последующим снижением температуры до -4...-6 °C на пять дней (промораживание), световой режим сохраняли прежним.

Для лабораторных анализов на всех этапах исследования (контроль, холод, промораживание) использовали третий (для выделения РНК) и четвертый (для физиологических анализов) листья сверху. Для физиологических анализов и выделения РНК каждая из трех повторностей представляла собой смешанную пробу из листьев от трех растений.

Фенотипирование устойчивости к холоду. Кондуктометрическим методом определяли относительную электропроводность тканей (%), стабильность клеточных мембран и повреждение тканей листа (%) – с помощью портативного кондуктометра ST300C (Ohaus). Навеску 200 мг свежего листа погружали в 150 мл деионизированной воды, определяли электропроводность сразу после погружения (L0), затем через 2 ч (L1), далее кипятили на водяной бане 60 мин при 100 °C и определяли электропро-



Рис. 1. Габитус растений чая, включенных в эксперимент. Слева – неустойчивый генотип Колхида; справа – устойчивый генотип А-2016.

водность после остывания раствора (L2). Относительную электропроводность рассчитывали по формуле:

$$REC (\%) = L0/L1 \times 100.$$

Стабильность клеточных мембран (СМІ, %) вычисляли по формуле:

$$СМІ = (1 - (L1/L2)) / (1 - (C1/C2)) \times 100,$$

где C1 и C2 – средняя электропроводность контроля до и после кипячения соответственно (Вајји et al., 2002). Степень повреждения тканей оценивали как 100 – СМІ. Статистическую обработку полученных данных выполняли методом однофакторного дисперсионного анализа.

Анализ экспрессии генов. Выделение РНК из свежих листьев проводили с использованием наборов реагентов Лира (<http://biolabmix.ru/>). Качество РНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле, ее концентрацию определяли на приборе BioDrop μ Lite (Serva). Разведенную РНК обрабатывали ДНКазой и подтверждали отсутствие примесей геномной ДНК методом qRT-PCR. Обратную транскрипцию осуществляли набором реагентов M-MuLV-RH (<http://biolabmix.ru/>). Количественный анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени делали на приборе LightCycler96 (Roche). Смесь ПЦР готовили на основе наборов реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2 \times) (<http://biolabmix.ru/>). Объем смеси – 12.5 мкл, в нее входили по 0.5 мкл каждого праймера (из раствора 10 ммоль) (см. таблицу), 6.25 мкл буфера, 1 мкл кДНК (500 нг/мкл) и вода. Использовали стандартные условия для ПЦР с двухшаговой амплификацией (35 циклов), температурой отжига праймеров 60 °С. В качестве референсного гена был *Actin*, анализ экспрессии выполняли в трех биологических повторностях, данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LightCycler96. Относительный уровень экспрессии гена рассчитывали по алгоритму:

$$2^{-\Delta\Delta Cq},$$

где $\Delta\Delta Cq = (Cq_{gene\ of\ interest} - Cq_{internal\ control})_{treatment} - (Cq_{gene\ of\ interest} - Cq_{internal\ control})_{control}$

Гены и праймеры, используемые в исследовании

Ген	Последовательность праймеров, 5'–3'	Лит. источник
<i>Actin</i>	F: CCATCACCAGAATCCAAGAC R: GAACCCGAAGCGCAATAGG	Hao et al., 2014
<i>ICE1</i>	F: ATGTTTGTAGCCGAGAC R: GCTTTGATTTGGTCAGGATG	Ban et al., 2017
<i>CBF1</i>	F: AGAAATCGGATGGCTTGTGT R: TTGTCGTCTCAGTCGACGTT	
<i>DHN1</i>	F: ACACCGATGAGGTGGAGGTA R: AATCCTCGAACTTGGGCTCT	
<i>DHN2</i>	F: ACTTATGGCACCAGGACTAC R: CTCCTCCTCCCTCCTTGAC	
<i>DHN3</i>	F: TCCACATCGGAGGCCAAAAG R: AACCTCCTCCTTGTGTCTC	
<i>NAC17</i>	F: CCAAAGAACAGAGCCACG R: TGGGTATGAAGGAGTTGGG	Wang et al., 2016a
<i>NAC26</i>	F: ACAAACTACGCCACAATGC R: AGGGAGGGTCTTTTCAGG	
<i>NAC30</i>	F: ATTTCAAGGGGTTTCAAGCA R: CAGAGAATTCATTCGCGG	
<i>bHLH7</i>	F: TCAACGATCAACGGACTT R: TCCTCCTCTCTCCTCAT	Cui et al., 2018
<i>bHLH43</i>	F: TCTCTGTGCTGCGAAGAC R: CCTCCGAGTGTGCCATT	
<i>P5CS</i>	F: AGGCTCATTGGACTTGTGACT R: CATCAGCATGACCCAGAACAG	Ban et al., 2017
<i>WRKY2</i>	F: GAGACAGAAATGAGCAGGGAAAA R: TGTATCGGTGTCAGTTGGGTAGA	Wang et al., 2016b
<i>LOX1</i>	F: TCTTGATTAATGCCGATGG R: AAATGCCTCCAATGGTTC	Zhu et al., 2018
<i>LOX6</i>	F: GACCCAAGCCTCACAATAG R: GCTTCATTTATGCTACTCACAC	
<i>LOX7</i>	F: ATTTCTCTTCTCCTACTCTCAC R: GAACACCTCTCCATCACACT	
<i>SnRK1.1</i>	F: GTTCAAACTCATCTTCTCGCT R: ATGGTTCTTGTCCAATCCCATCT	Yue et al., 2015
<i>SnRK1.2</i>	F: TCTGCTGCTTAGCTGTGGG R: GCTCGAGACTGTAGGCCAAG	
<i>SnRK1.3</i>	F: TTGGAGTTGCGGTGTCACTT R: CGGGCACCATGAGACAAC	

Результаты

Исследования показали, что холодное воздействие (0...+2 °С) не приводило к существенным изменениям показателей электропроводности тканей листа. При промораживании (–4...–6 °С) значительно возрастал относительный уровень электропроводности, а стабильность клеточных мембран снижалась, что свидетельствует о повышении выхода электролитов из тканей. При этом растения более устойчивого генотипа в меньшей степени повреждались морозом, чем растения неустойчивого генотипа (рис. 2).

Относительный уровень экспрессии всех генов, включенных в эксперимент, повышался при индукции низкотемпературного стресса (рис. 3). При сравнении ответа

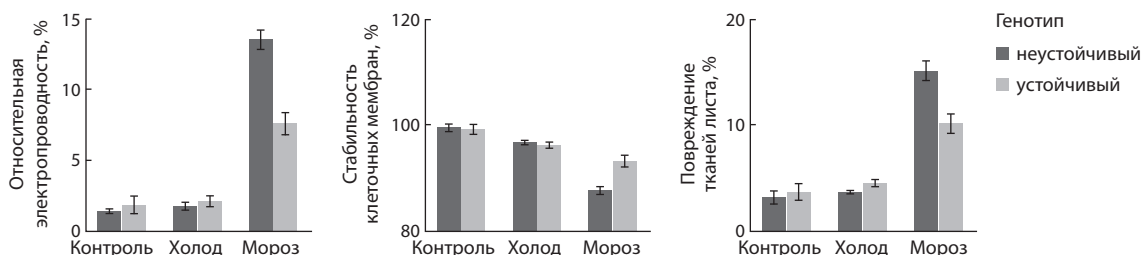


Рис. 2. Фенотипирование ответа неустойчивого и устойчивого генотипов чая при индукции холода (0...+2 °С) и промораживания (-4...-6 °С).

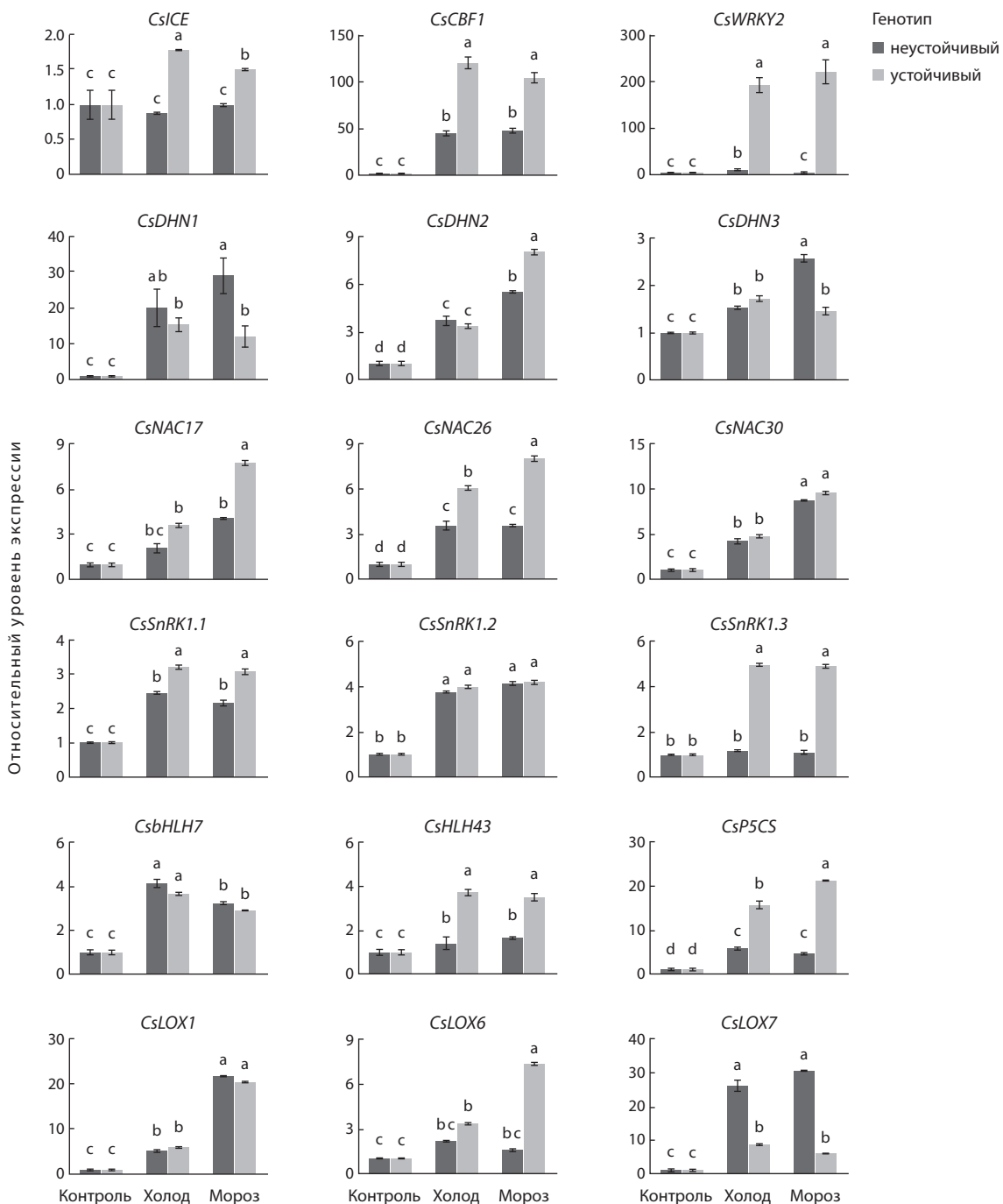


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов холодового ответа в листьях чая при индукции холода (0...+2 °С) и мороза (-4...-6 °С).

Буквы над столбцами показывают достоверность различий при уровне значимости 0.05.

холод/мороз достоверные различия наблюдались по экспрессии генов *ICE1*, *WRKY2*, *DHN*, *NAC*, *bHLH7*, *LOX1*, *LOX6*, *P5CS*. По другим генам различия в ответе на холод/мороз несущественны.

При сравнении ответа устойчивый/неустойчивый генотип по большинству генов выявлены значимые различия. Из 18 генов 11 проявили более высокий уровень экспрессии у устойчивого генотипа.

Экспрессия гена-регулятора холодного ответа *ICE1* у устойчивого генотипа достоверно повышалась в 1.5–1.8 раза при индукции стресса. У неустойчивого генотипа она оставалась на уровне контроля. Транскрипты *CBF1* накапливались у устойчивого генотипа в 3 раза сильнее, чем у неустойчивого, и составили 120 и 45 единиц соответственно. Апрегуляция гена *WRKY2* усиливалась при холоде и промораживании в большей степени у устойчивого генотипа – в 200 раз. Транскрипты генов дегидринов *DHN* усиленно накапливались у обоих генотипов при низкотемпературном стрессе. Достоверные различия между генотипами отмечены только по экспрессии *DHN2*. Оверэкспрессия трех генов семейства *NAC* наблюдалась при низкотемпературном стрессе у чая, которая в среднем составила 2–9 единиц. При этом устойчивый генотип отличался более высокой экспрессией генов *NAC26* и *NAC17* в сравнении с неустойчивым. Гены *HLH7* и *HLH43* также усиленно экспрессировались при холоде и промораживании в 3–4 раза, при этом *HLH43* активнее проявился у устойчивого генотипа. По гену *HLH7* различий между двумя генотипами не отмечено.

Экспрессия генов семейства *LOX* также повышалась в 5–26 раз при индукции холода и мороза. У устойчивого генотипа более активно проявился ген *LOX6* – в 3 и 7 раз – при холоде и морозе соответственно. Ген *LOX7* в большей степени активен при холоде у неустойчивого генотипа, а ген *LOX1* экспрессировался одинаково у двух генотипов. Три гена семейства *SnRK* апрегулировались у обоих сортов, ~2–4 раз при холоде и морозе, при этом у устойчивого генотипа отмечен более высокий уровень экспрессии *SnRK1.1* и *SnRK1.3*, по сравнению с неустойчивым сортом.

В целом сравнительный анализ экспрессии генов у двух генотипов показал, что устойчивый генотип раньше реагирует на стресс, транскрипты ряда генов у него сильнее накапливаются уже на этапе холодной акклиматизации. Гены *ICE1*, *CBF1*, *WRKY2*, *DHN2*, *NAC17*, *NAC26*, *SnRK1.1*, *SnRK1.3*, *bHLH43*, *P5CS*, *LOX6*, проявились в большей степени у устойчивого генотипа чая при низкотемпературном воздействии и могут быть маркерами для отбора доноров устойчивости к холоду.

Обсуждение

Проведен сравнительный анализ экспрессии генов у двух контрастных по устойчивости генотипов чая в условиях индукции холода и промораживания для выявления различий в их ответных реакциях.

В анализ был включен ряд генов, которые, как ранее сообщалось, играют или могут играть важную роль в ответе на холод/мороз стресс. В опубликованных транскриптомных исследованиях показано, что ответ на холод и мороз у чайного растения различается (Li et al., 2019), поэтому

мы сравнивали относительный уровень экспрессии генов в условиях этих двух стрессовых воздействий. В результате обнаружен ряд генов, которые экспрессируются по-разному в условиях холода и мороза; установлены гены, различающиеся по уровню экспрессии у устойчивого и восприимчивого к морозу генотипов. Сравнение уровня экспрессии у двух различных по устойчивости генотипов может помочь предположить, какие из этих генов могут быть маркерами для поиска доноров устойчивости в селекции чая.

Низкотемпературный стресс приводит к нарушению стабильности клеточных мембран, изменению липидного, белкового и ферментного баланса клетки, вызванному окислительными процессами (Somerville, 1995; Thomashow et al., 1999). Наши результаты подтвердили, что А-2016 более морозоустойчив, чем сорт Колхида, так как у него в большей степени сохранялась целостность клеточных мембран при индукции заморозков.

Обнаружено, что у устойчивого генотипа более активно экспрессировались гены *ICE1*, *CBF1*, *DHN2*, *NAC17*, *NAC26*, *bHLH43*, *WRKY2*, *P5CS*, *LOX6*, *SnRK1.1*, *SnRK1.3* и их экспрессия была существенно выше уже на стадии холодной акклиматизации, т. е. на первом этапе индукции стресса. Эти результаты согласуются с данными опубликованных исследований, в которых повышенная устойчивость растений чая обусловлена более быстрым ответом на холод/мороз стресс (Ban et al., 2017; Li et al., 2019).

Известно, что *DHNs* – группа генов, кодирующих белки-дегидрины, которые действуют как криопротекторы, молекулярные шапероны, а также антиоксиданты, играя базовую роль в ответе растений на абиотические стрессы, входят в семейство транскрипционных факторов *LEA* II (Late Embryogenesis Abundant) (Hanin et al., 2011). Из трех генов *DHN*, ген *DHN2* может служить маркером холодоустойчивых сортов чая, что согласуется с ранее опубликованными данными по китайским генотипам чая (Ban et al., 2017).

Семейство транскрипционных факторов *NAC* кодирует белки, играющие важную роль в передаче ауксинового сигнала и развитии меристем, латеральных корней, клеточной стенки, биосинтезе флавоноидов и др. По данным других исследователей, экспрессия этих генов индуцируется засухой, засолением, холодом и повышением содержания абсцизовой кислоты (АБК) (Wang et al., 2016a). Наши результаты также подтверждают повышение уровня экспрессии этих генов у обоих генотипов как при холоде, так и при промораживании.

Гены семейства *WRKY* участвуют в АБК-зависимом пути ответа на абиотический стресс, а также в регуляции роста и развития растений. У чайного растения был выделен новый ген этого семейства, *CsWRKY2*, экспрессия которого повышалась при холодном стрессе (Wang et al., 2016b). Полученные нами результаты согласуются с этими данными, к тому же у устойчивого генотипа *CsWRKY2* проявился более активно и при холоде, и при морозе, поэтому мы предполагаем, что он также может быть одним из маркеров устойчивости.

Гены *SnRK1.1*, *SnRK1.2*, *SnRK1.3* кодируют ферменты протеинкиназы, регулирующие катаболизм углеводов,

экспрессию генов метаболизма сахарозы, в частности генов *SUS*. В ответ на холод у чайного растения экспрессия этих генов существенно возрастала, что отмечено и у китайских сортов чая (Yue et al., 2015). Кроме того, по нашим данным, устойчивый генотип характеризовался более активной экспрессией *SnRK1.1* и *SnRK1.3*, следовательно, углеводный метаболизм у него протекал более активно.

К семейству транскрипционных факторов *bHLH*, участвующих в широком спектре биологических процессов, относятся: вторичный метаболизм брассиностероидов, жасмоновой кислоты, синтез антоцианов, модуляция роста и развития растений, контроль ветвления побегов и др. Кроме того, *bHLH* играют важную роль в передаче сигнала АБК и ответе растений на абиотические стрессы. У чайного растения обнаружено 39 генов *CsbHLH*, экспрессия которых повышалась в условиях засухи (Cui et al., 2018). Мы анализировали экспрессию двух генов из этого семейства, и оба из них апрегулировались при низкотемпературном стрессе, а ген *bHLH43* активнее экспрессировался у устойчивого генотипа.

Гены семейства липоксигеназ *LOX* вовлечены в катаболизм липидов, синтез оксипипина, жасмоновой кислоты и С6-альдегидов (Li et al., 2017). У чайного растения обнаружено, что гены *CsLOX1*, *CsLOX6* и *CsLOX7* могут играть важную роль в ответе на стрессы (холод, засуху, биотический стресс) в АБК-независимом пути ответа (Zhu et al., 2018), поэтому мы включили эти гены в эксперимент. В наших результатах показано, что эти три гена экспрессировались сильнее при холоде и промораживании, в сравнении с контролем, однако у устойчивого генотипа только ген *LOX6* более активно экспрессировался при стрессе, в сравнении с неустойчивым.

Ген *P5CS* – один из генов, вовлеченных в синтез пролина (Szekely et al., 2008). Более высокий уровень его экспрессии наблюдался при холоде у устойчивого генотипа чая. Достоверных различий экспрессии этого гена между устойчивыми и неустойчивыми сортами чая не отмечено (Ban et al., 2017). Проведение дополнительных исследований с разными сортами поможет верифицировать полученные данные.

Заключение

Таким образом, показана повышенная экспрессия всех изучаемых генов: *DHN1*, *DHN2*, *DHN3*, *NAC17*, *NAC26*, *NAC30*, *bHLH7*, *bHLH43*, *WRKY2*, *LOX1*, *LOX6*, *LOX7*, *SnRK1.1*, *SnRK1.2*, *SnRK1.3*. Выявлен ряд генов, более активно экспрессирующихся у устойчивого генотипа чая: *ICE1*, *CBF1*, *DHN2*, *NAC17*, *NAC26*, *bHLH43*, *WRKY2*, *P5CS*, *LOX6*, *SnRK1.1*, *SnRK1.3*. Обнаружены гены, различающиеся по экспрессии в холоде и в морозе: *ICE1*, *WRKY2*, *DHN*, *NAC*, *bHLH7*, *LOX1*, *LOX6*, *P5CS*. В целом устойчивый генотип характеризуется более ранним ответом на стресс. Однако в нашей работе проанализировано только два генотипа чая, поэтому для дальнейшей верификации маркеров устойчивости к холоду необходимо привлечение большего количества генотипов. Для дальнейших исследований актуально изучение экспрессии этих генов в других органах растений чая при разной силе низкотемпературного воздействия.

Список литературы / References

- Гвасалия М.В. Спонтанные и индуцированные сорта и формы чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) во влажных субтропиках России и Абхазии, перспективы их размножения и сохранения в культуре *in vitro*. Краснодар, 2015.
- [Gvasaliya M.V. Spontaneous and Induced Cultivars and Forms of Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in Humid Subtropics of Russia and Georgia: Prospects for their Cultivation and *in vitro* Conservation. Krasnodar, 2015. (in Russian)]
- Самарина Л.С., Малюкова Л.С., Гвасалия М.В., Ефремов А.М., Малярковская В.И., Лошкарёва С.В., Туов М.Т. Генетические механизмы акклиматизации чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) к холодному стрессу. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(8):958-963. DOI 10.18699/VJ19.572.
- [Samarina L.S., Malyukova L.S., Gvasaliya M.V., Efremov A.M., Malyarovskaya V.I., Loshkareva S.V., Tuov M.T. Genes underlying cold acclimation in the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8):958-963. DOI 10.18699/VJ19.572. (in Russian)]
- Туов М.Т., Рындин А.В. Итоги изучения перспективных гибридов чая в субтропиках Российской Федерации. *Субтропическое и декоративное садоводство*. 2011;44:101-109.
- [Tuov M.T., Ryndin A.V. The results of studying prospective hybrids of tea plant in subtropics of the Russian Federation. *Subtropicheskoye i Dekorativnoye Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture*. 2011;44:101-109. (in Russian)]
- Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 2002;36:61-70. <https://doi.org/10.1023/A:1014732714549>.
- Ban Q., Wang X., Pan C., Wang Y., Kong L., Jiang H., Xu Y., Wang W., Pan Y., Li Y., Jiang Ch. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188514. DOI 10.1371/journal.pone.0188514.
- Chen J., Gao T., Wan S., Zhang Y., Yang J., Yu Y., Wang W. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the *HSP* gene superfamily in tea plant (*Camellia sinensis*). *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:2633. DOI 10.3390/ijms19092633.
- Cui X., Wang Y.-X., Liu Z.-W., Wang W.-L., Li H., Zhuang J. Transcriptome-wide identification and expression profile analysis of the *bHLH* family genes in *Camellia sinensis*. *Funct. Integr. Genomics*. 2018;18:489-503. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0608-x>.
- Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and coldresponsive gene expression. *Plant J.* 2003;33:751e763.
- Hanin M., Brini F., Ebel Ch., Toda Y., Takeda Sh., Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* 2011;6(10):1503-1509. DOI 10.4161/psb.6.10.17088.
- Hao X., Horvath D.P., Chao W.S., Yang Y., Wang X., Xiao B. Identification and evaluation of reliable reference genes for quantitative real-time PCR analysis in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:22155-22172. DOI 10.3390/ijms15122155.
- Hao X., Wang L., Zeng J., Yang Y., Wang X. Response and adaptation mechanisms of tea plant to low-temperature stress. In: Han W.Y., Li X., Ahammed G. (Eds.) *Stress Physiology of Tea in the Face of Climate Change*. Singapore: Springer, 2018:39-61. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2140-5_3.
- Li L., Lu X., Ma H., Lyu D. Jasmonic acid regulates the ascorbate-glutathione cycle in *Malus baccata* Borkh. roots under low rootzone temperature. *Acta Physiol. Plant.* 2017;39:174.
- Li Y., Wang X., Ban Q., Zhu X., Jiang Ch., Wei Ch., Bennetzen J.L. Comparative transcriptomic analysis reveals gene expression asso-

- ciated with cold adaptation in the tea plant *Camellia sinensis*. *BMC Genomics*. 2019;20(1):624. DOI 10.1186/s12864-019-5988-3.
- Megha S., Basu U., Kav N.N.V. Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs. *Plant Cell Environ.* 2018;41:1-15.
- Morsy M.R., Almutairi A.M., Gibbons J., Yun S.J., de Los Reyes B.G. The OsLti6 genes encoding low-molecular-weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. *Gene*. 2005;344:171e180.
- Shen W., Li H., Teng R., Wang Y., Wang W., Zhuang J. Genomic and transcriptomic analyses of *HD-Zip* family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*). *Genomics*. 2018. DOI 10.1016/j.ygeno.2018.07.009.
- Somerville C. Direct tests of the role of membrane lipid composition in low temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:6215e6218.
- Szekely G., Abraham E., Cseplo A., Rigó G., Zsigmond L., Csiszár J., Ayaydin F., Strizhov N., Jásik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 2008;53(1):11-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x>.
- Thomashow M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999;50:571-599.
- Wang Y., Jiang C.J., Li Y.Y., Wei C.L., Deng W.W. *CsICE1* and *CsCBF1*: two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis*. *Plant Cell Rep.* 2012;31:27-34. DOI 10.1007/s00299-011-1136-5.
- Wang Y.-X., Liu Z.-W., Wu Z.-J., Li H., Zhuang J. Transcriptome-wide identification and expression analysis of the *NAC* gene family in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *PLoS One*. 2016a; 11(11):e0166727. DOI 10.1371/journal.pone.0166727.
- Wang Y., Shu Z., Wang W., Jiang X., Li D., Pan J., Li X. *CsWRKY2*, a novel *WRKY* gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses. *Biol. Plant*. 2016b;60:443-451. DOI 10.1007/s10535-016-0618-2.
- Yuan H.Y., Zhu X.P., Zeng W., Yang H.M., Sun N., Xie S.X., Cheng L. Isolation and transcription activation analysis of the *CsCBF1* gene from *Camellia sinensis*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2013;110:147-151.
- Yue C., Cao H.L., Wang L., Zhou Y.H., Huang Y.T., Hao X.Y., Wang Y.C., Wang B., Yang Y.J., Wang X.C. Effects of CA on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season. *Plant Mol. Biol.* 2015;88:591-608. DOI 10.1007/s11103-015-0345-7.
- Zhu J., Wang X., Guo L., Xu Q., Zhao S., Li F., Yan X., Liu Sh., Wei Ch. Characterization and alternative splicing profiles of the lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant Cell Physiol.* 2018;59(9):1765-1781. DOI 10.1093/pcp/pcy091.

ORCID ID

L.S. Samarina orcid.org/0000-0002-0500-1198
V.I. Malyarovskaya orcid.org/0000-0003-4213-8705

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования, науки и молодежной политики Краснодарского края (проект р_мол_а № 19-416-233033). Растительный материал для проведения настоящей работы предоставлен в рамках программы сохранения геноресурсов (№ 0683-2019-0002) Министерства науки и высшего образования РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.01.2020. После доработки 06.07.2020. Принята к публикации 07.07.2020.

Phenotypic and genetic variability of a tetraploid wheat collection grown in Kazakhstan

A. Zatybekov¹, S. Anuarbek^{1, 2}, S. Abugalieva¹, Y. Turuspekov^{1, 2} ✉

¹ Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

² Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

✉ e-mail: yerlant@yahoo.com

Abstract. New cultivars adapted to major durum wheat growing environments are essential for the cultivation of this crop. The development of new cultivars has required the availability of diverse genetic material and their extensive field trials. In this work, a collection of tetraploid wheat consisting of 85 accessions was tested in the field conditions of Almaty region during 2018 and 2019. The accessions were ranged according to nine agronomic traits studied, and accessions with the highest yield performance for Almaty region of Kazakhstan were revealed. The ANOVA suggested that the performance of agronomic traits were influenced both by Environment and Genotype. Also, the collection was analyzed using seven SSR (simple sequence repeats) markers. From 3 to 6 alleles per locus were revealed, with an average of 4.6, while the effective number of alleles was 2.8. Nei's genetic diversity was in the range of 0.45–0.69. The results showed high values of polymorphism index content (PIC) in the range of 0.46–0.70, with an average of 0.62, suggesting that 6 out of 7 SSRs were highly informative (PIC > 0.5). Phylogenetic analysis of the collection has allowed the separation of accessions into six clusters. The local accessions were presented in all six clusters with the majority of them grouped in the first three clusters designated as A, B, and C, respectively. The relations between SSR markers and agronomic traits in the collection were studied. The results can be efficiently used for the enhancement of local breeding projects for the improvement of yield productivity in durum wheat.

Key words: *Triticum turgidum*; genetic diversity; SSR markers; agronomic traits.

For citation: Zatybekov A., Anuarbek S., Abugalieva S., Turuspekov Y. Phenotypic and genetic variability of a tetraploid wheat collection grown in Kazakhstan. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):605-612. DOI 10.18699/VJ20.654

Фенотипическое и генетическое разнообразие коллекции тетраплоидной пшеницы, выращенной в Казахстане

А. Затыбеков¹, Ш. Әнуарбек^{1, 2}, С. Аbugалиева¹, Е. Туруспеков^{1, 2} ✉

¹ Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

✉ e-mail: yerlant@yahoo.com

Аннотация. В основе эффективных технологий выращивания полевых культур лежат новые сорта, адаптированные к условиям зоны производства. Создание таких сортов предполагает наличие коллекции с широким генетическим разнообразием и тщательные полевые экологические испытания. В данной работе коллекция тетраплоидной пшеницы, состоящая из 85 сортов и линий различного происхождения, была изучена в полевых условиях Алматинской области Казахстана в 2018 и 2019 гг. Образцы коллекции были ранжированы по девяти изученным сельскохозяйственным признакам, в результате чего выявлены линии с высокой продуктивностью в условиях Алматинской области. С помощью дисперсионного анализа удалось установить, что как окружающая среда, так и генотип оказывают статистически высокое влияние на хозяйственно ценные признаки. Коллекция была исследована также с использованием семи микросателлитных SSR (simple sequence repeats) маркеров. Обнаружено от 3 до 6 аллелей на локус со средним значением 4.6, тогда как среднее значение эффективного числа аллелей равнялось 2.8. Индекс генетического разнообразия коллекции по Нею был высоким, в пределах 0.45–0.69. Значения PIC (polymorphism index content) варьировали от 0.46 до 0.70, при этом шесть из семи SSR показали высокую информативность (PIC > 0.5). Филогенетический анализ коллекции позволил разделить образцы на шесть кластеров. Местные образцы были представлены во всех шести кластерах; большинство из них было сгруппировано в первых трех кластерах, обозначенных как А, В и С. Изучена связь между определенными SSR-маркерами и агрономическими признаками в рассматриваемой коллекции. Полученные результаты могут быть эффективно использованы для усиления отечественных селекционных проектов для улучшения продуктивности твердой пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum turgidum*; генетическое разнообразие; SSR-маркеры; хозяйственно ценные признаки.

Introduction

Durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. *durum* (Desf.) MacKey) is a tetraploid species of wheat and is the main crop to producers of pasta and cereals. The growing area under durum wheat is about 17 million hectares in the world and production is 37 million tons (Kabbaj et al., 2017; Zaïm et al., 2017). In 2019, durum wheat production in Kazakhstan amounted to 560 thousand tons (<https://agbz.kz>). Other tetraploid wheat species *Triticum turgidum* L. ssp. *turanicum* (Jakubz.) Á. Löve & D. Löve, *Triticum turgidum* L. ssp. *polonicum* (L.) Thell., *Triticum turgidum* L. ssp. *carthlicum* (Nevski) Á. Löve & D. Löve, *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* (Shrank ex Schübler) Thell. are used as food and feed crops in different world regions. Wild species *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (Korn. ex Asch. & Graebn.) Thell. is also often included in crossing schemes as a source for resistance to abiotic and biotic stresses (De Vita, Taranto, 2019; Mujeeb-Kazi et al., 2019).

The enhancement of a breeding program largely depends on an understanding of adaptation-related patterns that affect the productivity of cereal crops, including durum wheat. One of the ways to study these patterns is the assessment of diverse germplasm collections, including relative wild and cultivated species and landraces, in a particular environmental condition, and evaluate genotype × environment interaction features (Anuarbek et al., 2020). Hence, the comprehensive study of the diverse germplasm is a very important prerequisite for the successful conservation and rational use of plant genetic resources, including both wild and cultivated tetraploid wheat species (Maccaferri et al., 2003; Anuarbek et al., 2020). The appropriate assessment of the genetic diversity in these collections depends on the application of informative and efficient types of DNA markers. In many centers of the world, research is underway to find and use different types of DNA markers with the aim of using them to study genetic diversity, inventory, genotyping, mapping, and identifying genes associated with useful traits of cultivated plant varieties and lines (Idrees, Irshad, 2014). Various types of DNA markers have been developed and are successfully used to study the genetic diversity of accessions of the genus *Triticum* L. (Röder et al., 1998; Song et al., 2005; Singh et al., 2018). PCR-based markers, such as RAPD, AFLP, and SSR, are widely used tools for studying genetic diversity and discrimination both durum and common wheat (Khlestkina et al., 2002; Kudriavtsev et al., 2004; Yildirim et al., 2011; Abugalieva et al., 2012; Mel-loul et al., 2014; Adonina et al., 2017).

The wheat genome contains a class of specific nucleotide sequences called microsatellites, also known as SSRs or simple sequences repeats (Ganal, Röder, 2007). SSR markers have many advantages, being highly polymorphic, codominant, informative, reliable, and the availability of information on chromosomal localization (Röder et al., 1998; Vieira et al., 2016). Microsatellites are hypervariable, they often have dozens of alleles at one locus, differing from each other in the number of repeats. They are widely used to study genetic diversity, as well as for the analysis of paternity and mapping of quantitative trait loci (QTLs), kinship, belonging to a specific population, for studying hybridization, evolutionary processes, and for searching for paralogs (Abouzied et al., 2013; Leonova et al., 2013; Jaiswal et al., 2017).

Durum wheat polymorphism studies are currently underway worldwide. The survey of reports demonstrated the successful use of SSR markers for assessment of the genetic diversity in different collections of Europe (Ganeva et al., 2010; Marzario et al., 2018), Africa (Henkrar et al., 2016; Slim et al., 2019), China (Wang et al., 2007; Chen et al., 2012), Russia (Kudryavtsev et al., 2004), Turkey (Yildirim et al., 2011), Syria (Achtar et al., 2010), etc. Microsatellites are also highly effective in tagging specific genes that play an important role in variation for yield components and biotic stress resistance. A number of studies reported relations between SSR loci and wheat traits, such as yield, etc. For instance, Zhang et al. (2013) showed that the *Xgwm11-1B* locus is significant ($p < 0.001$) for plant height. In the study reported by Li et al. (2015) it was shown that the marker *Xgwm148-2B* is associated with the manifestations of the traits “thousand grain weight”, “spike yield index” and “weight of kernels per spike”. *Xgwm251* was associated with lipoxygenase (LOX) activity, which is an important factor determining the color of flour and end-use products of wheat (Geng et al., 2010). Vinod et al. (2014) have identified the significant association between *Xgwm234* and the resistance of *T. turgidum* to leaf rust. Golabadi et al. (2011) showed that the *Xcfa2114-6A* marker was responsible for 20 % of the phenotypic variation in the yield index and thousand grain weights (TGW) under different environmental conditions. SSR marker *Xgwm219* was also shown to be associated with TGW (Roncallo et al., 2017). These examples suggest that the assessment of the genetic diversity of the varietal gene pool of durum wheat may provide not only proper genetic documentation of the accessions but also hinting the identification of a valuable source of genes associated with agronomic traits.

The purpose of this work was the study the genetic diversity using seven SSR markers and phenotypic variation in yield components in the collection of tetraploid species harvested in the conditions of South-East Kazakhstan.

Materials and methods

Plant material and experimental site conditions. The plant material consisted of 85 accessions of tetraploid wheat (2 *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (Korn. ex Asch. & Graebn.) Thell., 2 *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* (Shrank ex Schübler) Thell., 65 *Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. *durum* (Desf.) MacKey, 10 *Triticum turgidum* L. ssp. *turanicum* (Jakubz.) Á. Löve & D. Löve, 4 *Triticum turgidum* L. ssp. *polonicum* (L.) Thell., and 2 *Triticum turgidum* L. ssp. *carthlicum* (Nevski) Á. Löve & D. Löve from different geographical origins (Supplementary Table 1)¹. Seeds were provided by the Research Center for Grain and Industrial Crops (Foggia, Italy), University of Bologna (Bologna, Italy), Aktobe and Karabalyk Agricultural Experimental Stations (Kazakhstan). The collection included 21 cultivars and 15 promising lines of durum wheat from Kazakhstan (see Suppl. Table 1).

The studied collection of tetraploid wheat was evaluated in two randomized replicates in the field conditions of Almaty region (Table 1).

Each accession was planted in two rows with a row spacing of 15 cm, 25 seeds per row. In total, nine agronomic traits con-

¹ Supplementary Tables 1 & 2 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx9.pdf>

Table 1. Meteorological conditions and characteristics of the experimental site

Year	Precipitation, mm	Coordinate			Temperature, °C			Sowing date	Harvesting date
		latitude	longitude	altitude, m	mean	min	max		
2018	311.6	43°21'	76°53'	740	20.2	-1.7	37.7	15.04.18	01.08.18
2019	396.0	43°21'	76°53'	740	18.7	-2.9	37.6	28.03.19	04.08.19

Note: T mean, T max and T min – average, maximum and minimum temperature during the vegetative period, respectively.

nected with the vegetation period, plant morphology, and yield components were studied. The list of traits included the heading time (HT, days), flowering time (FT, days), seed maturation time (SMT, days), plant height (PH, cm), spike length (SL, cm), number of fertile spikes (NFS, pcs), number of kernels per spike (NKS, pcs), thousand kernel weight (TKW, g), and yield per plant (YPP, g) (Anuarbek et al., 2020).

DNA extraction and SSR genotyping. Genomic DNA was isolated from individual 4-day-old wheat seedlings, according to Dellaporta et al. (1983). The quality and quantity of isolated DNA were evaluated using a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) and agarose electrophoresis in 1 % gel. The list of markers used for SSR analysis was the following: *Xgwm11*, *Xgwm148*, *Xgwm251*, *Xgwm234*, *Xcfa2114*, *Xgwm169*, and *Xgwm219* (Supplementary Table 2). Polymerase chain reaction (PCR) was conducted in a Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA). The PCR reaction mixture (10 µl) contained from 2.5 mM of 10× Taq buffer; 0.2 mM of each dNTP; 1.5 mM MgCl₂; 250 µM of each primer; 1 unit Taq polymerase (Promega, USA) and 50 ng of genomic DNA.

The amplification program included the following cycles: 94 °C – 3 min; 40 cycles: 94 °C – 1 min; annealing temperature (55 or 60 °C depending on the primer) – 1 min; 72 °C – 2 min; and 72 °C – 10 min. PCR products were separated on 6 % polyacrylamide gels (Amresco, Solom, OH) run in 0.5× TBE buffer pH 8.0 at 250 V for 1.5 h. Gels were stained with ethidium bromide, and the images were recorded with a Bio-Rad Image System (Bio-Rad, Hercules, CA). Allele sizes were estimated in comparison with 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

Statistical analyses of field data were estimated using SPSS 22.0 and STATISTIKA 13.2 software (<http://software.dell.com/products/statistica>).

Genetic diversity was assessed based on Nei's genetic diversity index and Shannon Information Index, using the GenAlex, ver.6.5 program (Peakall, Smouse, 2012). The values of the PIC index (polymorphism information content) suggested the effectiveness of the markers used, given that markers with a value of PIC > 0.5 considered as highly informative; 0.5 > PIC > 0.25 as informative; and PIC ≤ 0.25 as marginally informative (Botstein et al., 1980). Variation among populations was studied using Principal Coordinate Analysis (PCoA) in the software GenAlex, ver.6.5 (Peakall, Smouse, 2012). The resulting similarity matrix was further analyzed using the neighbor-joining clustering algorithm for the construction of the dendrogram. The phylogenetic tree was constructed using PAST v.3.25 software (Hammer et al., 2001). Analyses of marker-trait associations were conducted using a simple *t*-test (Kim, 2015).

Results

Phenotypic variation in the studied collection

Field trials for two years revealed a sharp difference in the vegetation period between species of tetraploid wheat (Table 2).

All accessions reached the ripening stage, with an except for the wild accession PI346783 (Hungary, *T. dicoccoides*). The shortest HT was observed in genotypes of *T. dicoccoides* (56.5 ± 3.5 days), the longest – in *T. polonicum* (60.7 ± 3.9 days) (see Table 2).

Plant height is one of the important morphological traits of the crops. According to the species, the highest ones were the samples from *T. carthlicum* (117.9 ± 5.4 cm), while the accessions from *T. dicoccum* were the lowest (97.4 ± 7.4 cm). On the other hand for *T. durum* genotypes the PH ranged from 58.0 ± 3.7 cm (Casanova 58.0 ± 3.7, Mexicali75 58.5 ± 4.9, Ciclope 60.5 ± 3.9) to 137.6 ± 3.0 cm for cultivar Kargala 66 (see Suppl. Table 1). As for the SL, the lowest value (5.0 ± 0.2 cm) had the cultivar PI 184526 (*T. turanicum* from Portugal), while the highest value (17.5 ± 1.7 cm) was in accession PI 210845 (*T. polonicum* from Iran).

The value of a cultivar is determined by its productivity, which consists of several components, including TKW which is significantly affected by weather conditions, violation of moisture supply, and mineral nutrition of plants during the formation and maturation of grain. The highest averaged TKW values were revealed for three *T. turanicum* accessions (CLTR11390, USA – 64.8 ± 4.1 g; PI 352514, Azerbaijan – 58.2 ± 1.0 g; and PI 254206, Iran – 55.2 ± 4.0 g) and *T. polonicum* from Iraq (PI 208911 – 61.8 ± 4.5 g). The lowest TKW value was in accessions of *T. carthlicum* (29.9 ± 1.1 g). The NFS ranged from 3.9 ± 0.6 pcs/plant in the accession PI 343446 (*T. dicoccoides*) to 2.0 ± 0.5 pcs/plant in genotypes PI 210845 and PI 266846 of *T. polonicum*.

As for NKS and YPP the highest value were on accessions of *T. durum* and the lowest to *T. dicoccoides* (see Table 2). The min value of NKS (24.8 ± 3.8 pcs) under both conditions was obtained in PI 343446 (*T. dicoccoides*, Israel), the max – in Kazakh cultivar Gordeiforme 254 (67.7 ± 7.1 pcs) and Canadian cultivar Strongfield (62.2 ± 1.2). Overall 31 *T. durum* accessions prevailed the local check cultivar Gordeiforme 254 (4.4 ± 1.6 g/plant) by YPP. Top twenty accessions by yield contained cultivars from Canada (Strongfield – 7.6 ± 1.9 g/plant), Spain (Granizo – 7.0 ± 1.9 g/plant), Italy (Capeiti-8 and Ancomarzio), Syria (Sharm5), Russia (Har'kovskaya 46, Altaika, Altaiskii yantar'), Ukraine (Har'kovskaya 90 and Har'kovskaya 9), USA (LO92), as well as 5 cultivars and 4 breeding lines (e.g. G 2607 – 7.2 ± 1.4 g/plant), from Kazakhstan (see Suppl. Table 1).

Table 2. Phenotypic variation in the collection of tetraploid wheat according to two-year field trials data

Traits	Species					
	<i>carthlicum</i>	<i>dicoccoides</i>	<i>dicoccum</i>	<i>durum</i>	<i>polonicum</i>	<i>turanicum</i>
HT, days	58.4±3.6	56.5±3.5	59.4±2.1	57.8±1.7	60.7±3.9	58.5±1.3
FT, days	62.1±4.4	59.0±3.0	65.3±1.8	62.9±2.2	66.5±2.6	64.7±1.7
SMT, days	33.3±1.8	35.8±2.3	34.4±2.6	37.9±1.7	32.4±1.4	36.3±2.3
PH, cm	117.9±5.4	107.5±1.2	97.4±7.4	100.4±5.3	110.1±3.4	98.1±8.6
SL, cm	9.6±0.1	8.4±0.3	9.8±1.7	7.6±0.5	13.1±1.0	8.6±0.5
NFS, pcs	3.5±0.6	3.9±0.6	2.3±0.2	2.8±0.4	2.0±0.5	2.1±0.3
NKS, pcs	40.3±4.1	24.8±3.8	29.9±0.9	45.9±3.4	35.8±3.0	37.3±4.3
TKW, g	29.9±1.1	35.0±1.1	39.8±1.3	44.6±3.0	47.6±3.1	48.0±4.0
YPP, g	3.3±0.9	2.5±0.5	2.6±0.2	4.5±0.8	2.9±0.6	3.1±0.6

Note: HT – heading time, FT – flowering time, SMT – seed maturation time, PH – plant height, SL – spike length, NFS – number of fertile spikes, NKS – number of kernel per spike, TKW – thousand kernel weight, YPP – yield per plant.

Table 3. Two-way ANOVA based on two years field trials

Traits	Genotype (species)		Environment (year)		Genotype × Environment (species × year)	
	SS	F	SS	F	SS	F
HT	60.51	0.73	66.8	4.01*	69.67	0.84
FT	71.1	0.46	24.1	0.77	161.2	1.03
SMT	183.01	2.79*	69.75	5.32*	47.72	0.73
PH	1845.9	0.85	282.3	0.65	860.1	0.40
NFS	13.61	5.97***	0.58	1.26	3.97	1.74
SL	67.84	6.30***	16.23	7.53**	15.55	1.44
NKS	3547.44	11.54***	298.07	4.85*	145.69	0.47
TKW	1650.98	9.85***	35.53	1.06	326.09	1.95
YPP	49.22	5.06***	0.86	0.44	11.74	1.21

Note: The F values are provided with significance level indicated by the asterisks. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

The Pearson index analysis revealed a significant positive correlation ($p < 0.01$) between yield components and phenotypic traits. The ANOVA test based on two-years field trials suggested that Genotype significantly influenced the SMT, NFS, SL, and all yield components (NFS, NKS, TKW, YPP) with $p < 0.001$ (Table 3).

Microsatellite analysis of the tetraploid wheat collection

The lines and cultivars of the studied tetraploid wheat collection were analyzed using 7 polymorphic microsatellite markers (see Suppl. Table 2) localized on 6 wheat chromosomes – 1B, 2B, 4B, 5B, 6A, 6B. The results based on using 7 SSR markers have allowed identifying a total of 32 alleles, with average 4.57 alleles per marker (Table 4).

The effective number of alleles ranged from 1.82 to 3.27, with a mean value of 2.77. Nei's genetic diversity index averaged 0.62 (see Table 4). The average value of polymorphism information content (PIC) was 0.62, ranging from 0.46 for *Xgwm219* to 0.7 for *Xgwm148*, *Xgwm251*, and *Xgwm11*, respectively.

Table 4. Assessment of the level of genetic diversity of SSR markers in tetraploid wheat collection

SSR marker	na	ne	l	h	PIC
<i>Xgwm11</i>	6	3.27	1.38	0.69	0.70
<i>Xgwm148</i>	4	3.23	1.28	0.69	0.70
<i>Xgwm251</i>	6	3.19	1.29	0.69	0.69
<i>Xgwm234</i>	3	2.46	0.99	0.59	0.60
<i>Xcfa2114</i>	5	2.63	1.18	0.62	0.58
<i>Xgwm169</i>	4	2.75	1.13	0.63	0.64
<i>Xgwm219</i>	4	1.82	0.81	0.45	0.46
Mean	4.57	2.77	1.15	0.62	0.62
SE	1.13	0.52	0.19	0.08	0.09

Note: na – the number of alleles per locus; ne – the effective number of alleles; l – Shannon information index; h – Nei's diversity index; PIC – polymorphic information content.

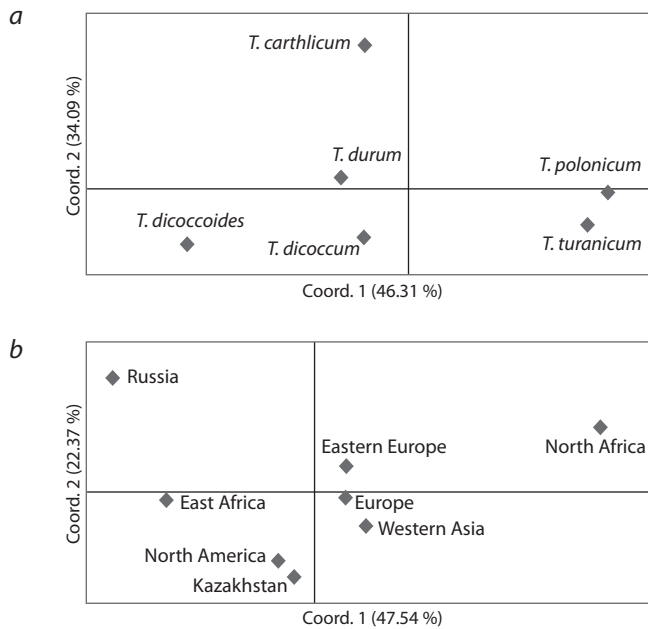


Fig. 1. Principal coordinate analysis for 85 tetraploid wheat accessions separated by species (a) and origin (b) groups based on SSR analysis.

The PCoA was conducted based on SSR genotyping of 85 tetraploid wheat accessions using 7 SSR markers. Accessions of the studied collection were divided into groups depending on their attribution to species and place of origin, respectively (Fig. 1).

The first principal component in the PCoA (46.31 %) clearly separated *T. polonicum* and *T. turanicum* from other species (see Fig. 1, a). The most genetically distant from other species was *T. carthlicum*. PCoA using origin data revealed that local genotypes were genetically closer to the North American accessions (see Fig. 1, b). The accessions from Russia and North Africa were genetically distant from other groups of origin.

Based on the genetic diversity results using 7 polymorphic SSR markers, a phylogenetic tree of 85 accessions of tetraploid wheat was constructed (Fig. 2).

The analysis revealed a division into two large clusters. The first cluster consisted mostly of cultivars of tetraploid wheat from Kazakhstan and North America. The second cluster was divided into three sub-clusters. Although the European accessions were dominated in all three subclusters of cluster 2, all three sub-clusters included cultivars and lines of Kazakhstan (see Fig. 2).

The *t*-test was performed to confirm the significance of the SSR markers for the studied traits. The results identified the most informative SSR markers related to major agronomic traits (Table 5). *Xgwm251* showed a significant relationship to HT and FT. Four markers were related to variance in PH (*Xcfa2114*, *Xgwm251*, *Xgwm234*, and *Xgwm169*).

Discussion

Initially, the studied collection was separated according to their species classification and origin (see Suppl. Table 1). The average yield analysis in the collection of tetraploid accessions over two years (2018 and 2019) suggested that it is highly correlated with all studied phenotypic traits ($p < 0.01$),

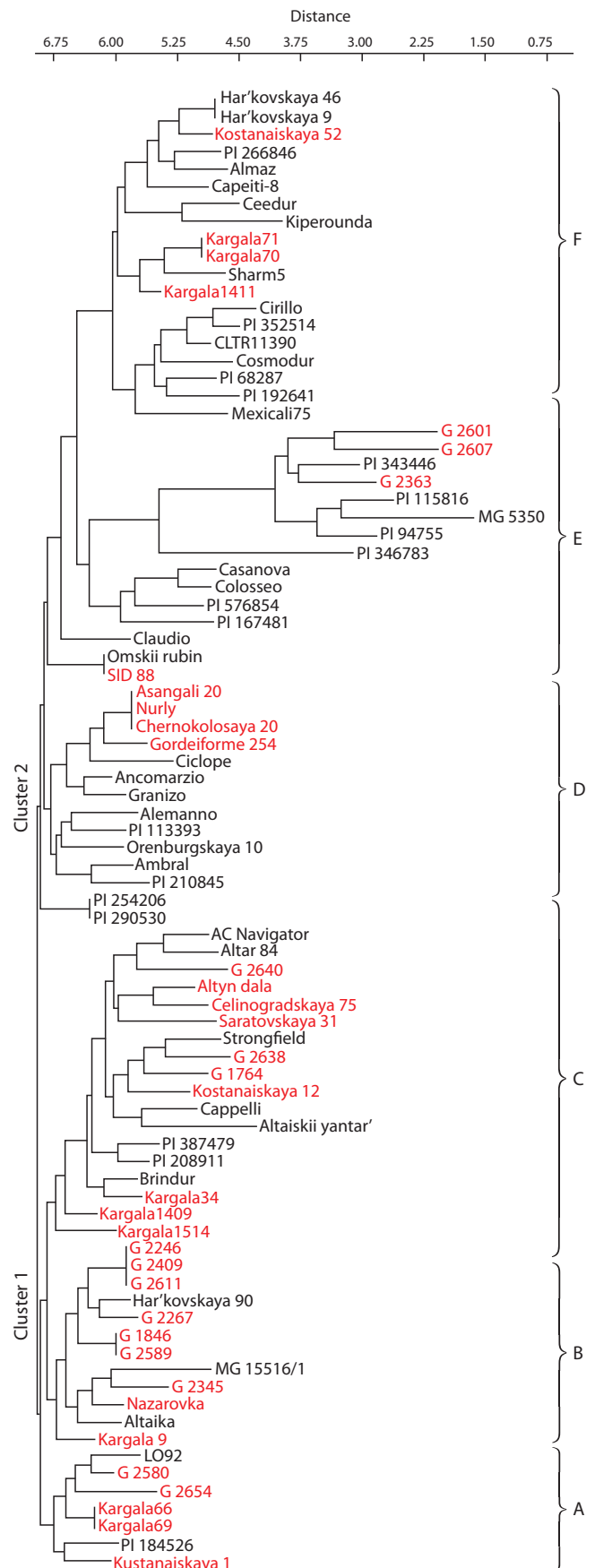


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree of 85 tetraploid wheat accessions based on SSR analysis. Sub-clusters are designated as A, B, C, D, E, and F.

Table 5. The *t*-test results on the identification of the relations between SSR markers and phenotypic traits

Traits	<i>Xgwm11</i>	<i>Xgwm148</i>	<i>Xgwm251</i>	<i>Xgwm234</i>	<i>Xcfa2114</i>	<i>Xgwm169</i>	<i>Xgwm219</i>
HT	0.62	0.68	2.17*	0.49	-0.36	-0.54	1.71
FT	0.79	0.80	2.05*	-0.14	0.19	-1.43	1.54
SMT	0.07	-0.88	-0.66	-1.10	-0.46	0.48	-0.07
PH	1.88	0.91	2.37*	-2.32*	-2.16*	2.29*	1.17
NFS	-0.53	0.26	0.93	0.19	-0.56	3.51***	1.12
SL	1.58	-0.96	1.53	0.60	-0.06	-2.27*	-0.20
NKS	0.95	-0.16	-0.92	0.44	1.01	1.49	2.30*
TKW	1.75	0.50	-1.68	2.33*	0.17	-1.29	-0.36
YPP	0.90	0.54	0.03	1.59	1.61	2.80***	2.36*

Note: The *t*-values are provided with significance level indicated by the asterisks. *** *p* < 0.001, ** *p* < 0.01, * *p* < 0.05.

confirming the importance of selected characters in the trials. The two-way ANOVA showed that Environment greatly influenced HT and SMT. In addition, it was found that SMT is also influenced by Genotype, showing the prospects of possibility to adjust maturation time in the breeding process, as early seed maturation is vital to avoid abiotic stresses during the important stages of plant growth. Particularly, it was shown that in *T. polonicum* the seeds are ripening nearly five days earlier than in *T. durum* (see Table 2). The field trials have allowed the identification of accessions with outstanding field performances. For instance, the cultivar Strongfield (Canada) showed 7.6 ± 1.9 g/plant, which was the highest yield value among 31 *T. durum* accessions that prevailed local standard Gordeiforme 254 (4.4 ± 1.6 g/plant). In general, two-way ANOVA indicated the great influence of the environmental factors, as they were affected both adaptation-related traits, such as HT and SMT, and yield components, such as SL and NKS (see Table 3).

The entire collection was studied using seven SSR markers that were located on six different chromosomes (see Suppl. Table 2). According to the previous works, a list of markers in this study was most useful to evaluation of genetic diversity and associations with agronomic traits of durum wheat (Royo et al., 2005). The average PIC value was higher than 0.6, suggesting that the level of polymorphism was very high. The high level of variation in the collection has effectively allowed the separation of accessions according to their species classification (see Fig. 1, a). Notably, the PC1 (46.3 %) separated *T. polonicum* and *T. turanicum* from the remaining species, and the PC1 (34.1 %) distinguished *T. carthlicum* and *T. durum* from *T. dicoccum* and *T. dicoccoides*. Interestingly, the accessions originated in Kazakhstan were genetically close to North American samples (see Fig. 1, b), and it is to some extent confirm the phylogeny of hexaploid bread wheat studies using SNP (single nucleotide polymorphism) markers (Turuspekov et al., 2015). The PC plot is suggesting that six accessions of durum wheat from the Russian Federation are distinctly different from accessions with other origins (see Fig. 1, b). The Neighbor-joining phylogenetic tree suggested that all accessions can be divided into two clusters, where cluster 1 was mostly populated by accessions from Kazakhstan (see Fig. 2).

The significance of each SSR marker for studied traits was assessed using a two-tailed *t*-test (Lüders et al., 2016; Rahimi et al., 2019). The results of the test suggested that five out of seven SSRs were significant at least for one studied trait (see Table 5). The PH was the trait where four SSR markers, two with negative and two with positive values, were significantly correlated. In addition, the test showed that *Xgwm234* is significantly correlated with TKW and *Xgwm219* and *Xgwm169* with YPP (see Table 5). Thus, the application of SSR markers in the analysis of tetraploid wheat collection consisting of 85 accessions was used for (1) genetic documentation of samples, (2) for phylogenetic clusterization based on the species classification and geographic origin, and (3) associations between DNA markers and studied phylogenetic traits. Hence, the results can be efficiently used for the enhancement of local breeding projects for the improvement of yield productivity in durum wheat.

Conclusion

The phenotypic analysis of the tetraploid wheat collection consisting of 85 accessions showed a high correlation of YPP with all 8 phenotypic traits in conditions of South-East Kazakhstan. The ANOVA suggested that the environmental conditions significantly affected the variation in HT and SMT, while Genotype has contributed significantly to main yield components, including TKW. Overall, 31 accessions of *T. durum* showed higher average yield values in comparison with local check cultivar Gordeiforme 254 (4.4 ± 1.6 g/plant), and Canadian cultivar Strongfield was with the highest yield value (7.6 ± 1.9 g/plant). The application of seven SSR markers suggested that local accessions were distinctly different from durum accession from other parts of the world. Particularly, the Principal Coordinate plot showed that local durum samples were most close to North American samples. The Neighbor-joining phylogenetic tree separated 85 samples to two main clusters, where the cluster 1 was mainly represented by Kazakh accessions and cluster 2 mostly by European accessions. The application of the *t*-test indicated that five out of seven SSRs were significant at least with one agronomic trait. Obtained results can be efficiently used for the enhancement of local breeding projects for the improvement of yield productivity in durum wheat.

References

- Abouziad H.M., Eldemery S.M.M., Abdellatif K.F. SSR-based genetic diversity assessment in tetraploid and hexaploid wheat populations. *Br. Biotechnol. J.* 2013;3(3):390-404.
- Abugalieva S., Volkova L., Yermekbayev K., Turuspekov Y. Genotyping of commercial spring wheat cultivars from Kazakhstan based on use of DNA microsatellite markers. *Biotehnologiya. Teoriya i Praktika = Biotech. Theory Practice.* 2012;2:35-45. DOI 10.11134/btp.2.2012.4. (in Russian)
- Achtar S., Moualla M.Y., Kalhout A., Röder M.S., MirAli N. Assessment of genetic diversity among Syrian durum (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Russ. J. Genet. (Genetika).* 2010;46(11):1500-1506. DOI 10.1134/S1022795410110074.
- Adonina I.G., Leonova I.N., Badaeva E.D., Salina E.A. Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7:6-13. DOI 10.1134/S2079059717010014.
- Anuarbek S., Abugalieva S., Pecchioni N., Laidò G., Maccaferri M., Tuberosa R., Turuspekov Y. Quantitative trait loci for agronomic traits in tetraploid wheat for enhancing grain yield in Kazakhstan environments. *PLoS One.* 2020;15(6):e0234863. DOI 10.1371/journal.pone.0234863.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32(3):314-331.
- Chen X., Min D., Yasir T.A., Hu Y.G. Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium in elite Chinese winter wheat investigated with SSR markers. *PLoS One.* 2012;7(9):e44510. DOI 10.1371/journal.pone.0044510.
- De Vita P., Taranto F. Durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) breeding to meet the challenge of climate change. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.). *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals.* Springer, Cham, 2019;5:471-524. DOI 10.1007/978-3-030-23108-8_13.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983;1(4):19-21. DOI 10.1007/BF02712670.
- Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. In: Varshney R.K., Tuberosa R. (Eds.). *Genomic-Assisted Crop Improvement.* Springer, Dordrecht, 2007;2:1-24. DOI 10.1007/978-1-4020-6297-1_1.
- Ganeva G., Korzun V., Landjeva S., Popova Z., Christov N.K. Genetic diversity assessment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol. Publ. online 2009. Publ. 2010;57(2):273-285.* DOI 10.1007/s10722-009-9468-5.
- Geng H., Zhang Y., He Z., Zhang L., Appels R., Qu Y., Xia X. Molecular markers for tracking variation in lipoxygenase activity in wheat breeding. *Mol. Breed.* 2010;28(1):117-126. DOI 10.1007/s11032-010-9466-5.
- Golabadi M., Arzani A., Mirmohammadi Maibody S.A.M., Sayed Tabatabaei B.E., Mohammadi S.A. Identification of microsatellite markers linked with yield components under drought stress at terminal growth stages in durum wheat. *Euphytica.* 2011;177(2):207-221. DOI 10.1007/s10681-010-0242-8.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):9.
- Henkrar F., El-Haddoury J., Ouabbou H., Nsarellah N., Iraqi D., Bendaou N., Mahabala U.S. Genetic diversity reduction in improved durum wheat cultivars of Morocco as revealed by microsatellite markers. *Sci. Agric.* 2016;73(2):134-141. DOI 10.1590/0103-9016-2015-0054.
- Idrees M., Irshad M. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *Eur. Acad. Res.* 2014;2(1):1513-1540.
- Jaiswal S., Sheoran S., Arora V., Angadi U.B., Iqbal M.A., Raghav N., Aneja B., Kumar D., Singh R., Sharma P., Singh G.P., Rai A., Tiwari R., Kumar D. Putative microsatellite DNA marker-based wheat genomic resource for varietal improvement and management. *Front. Plant Sci.* 2017;8:2009. DOI 10.3389/fpls.2017.02009.
- Kabbaj H., Sall A.T., Al-Abdallat A., Geleta M., Amri A., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Ortiz R., Bassi F.M. Genetic diversity within a global panel of durum wheat (*Triticum durum*) landraces and modern germplasm reveals the history of alleles exchange. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1277. DOI 10.3389/fpls.2017.01277.
- Khlestkina E.K., Pestsova E.G., Salina E., Röder M.S., Arbuzova V.S., Koval S.F., Börner A. Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS and SSR markers. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2002;7(2B):795-802.
- Kim T.K. T-test as a parametric statistic. *Korean J. Anesthesiol.* 2015;68(6):540. DOI 10.4097/kjae.2015.68.6.540.
- Kudryavtsev A.M., Martynov S.P., Broggio M., Buiatti M. Evaluation of polymorphism at microsatellite loci of spring durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties and the use of SSR-based analysis in phylogenetic studies. *Russ. J. Genet.* 2004;40(10):1102-1110.
- Leonova I.N., Badaeva E.D., Orlovskaya O., Roder M.S., Khotyleva L.V., Salina E.A., Shumny V.K. Comparative characteristic of *Triticum aestivum/Triticum durum* and *Triticum aestivum/Triticum dicoccum* hybrid lines by genomic composition and resistance to fungal diseases under different environmental conditions. *Russ. J. Genet. (Genetika).* 2013;49(11):1276-1283. DOI 10.1134/S1022795413110136.
- Li W., Zhang B., Li R., Chang Xi, Jing R. Favorable alleles for stem water-soluble carbohydrates identified by association analysis contribute to grain weight under drought stress conditions in wheat. *PLoS One.* 2015;10(3):1-15. DOI 10.1371/journal.pone.0119438.
- Lüders T., Ahlemeyer J., Förster J., Weyen J., Rossa E., Korzun V., Lex J., Friedt W., Ordon F. Verification of marker-trait associations in biparental winter barley (*Hordeum vulgare* L.) DH populations. *Mol. Breed.* 2016;36(2):14. DOI 10.1007/s11032-016-0438-2.
- Maccaferri M., Sanguineti M.C., Donini P., Tuberosa R. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2003;107:783-797. DOI 10.1007/s00122-003-1319-8.
- Marzario S., Logozzo G., David J., Zeuli P., Gioia T. Molecular genotyping (SSR) and agronomic phenotyping for utilization of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) *ex situ* collection from Southern Italy: a combined approach including pedigreed varieties. *Genes.* 2018;9(10):465. DOI 10.3390/genes9100465.
- Melloul M., Iraqi D., El Alaoui M., Erba G., Alaoui S., Ibriz M., Elfahime E. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique in response to drought stress in *Triticum durum*. *Food Technol. Biotechnol.* 2014;52(4):479-788. DOI 10.17113/ftb.52.04.14.3701.
- Mujeeb-Kazi A., Munns R., Rasheed A., Ogbonnaya F.C., Ali N., Hollington P., Dundas I., Saeed N., Wang R., Rengasamy P., Saddiq M.S., De Leon J.L.D., Ashraf M., Rajaram S. Breeding strategies for structuring salinity tolerance in wheat. *Adv. Agron.* 2019;155:121-187. DOI 10.1016/bs.agron.2019.01.005.
- Peakall R., Smouse P.E. GenA1EX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Public website of the news in Kazakhstan. <https://agbz.kz/zernovojrynok-2019/> (Accessed June 17, 2020).
- Rahimi Y., Bihanta M.R., Taleei A., Alipour H., Ingvarsson P.K. Genome-wide association study of agronomic traits in bread wheat reveals novel putative alleles for future breeding programs. *BMC Plant Biol.* 2019;19:541. DOI 10.1186/s12870-019-2165-4.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.-H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149:2007-2023.
- Roncallo P.F., Akkiraju P.C., Cervigni G.L., Echenique V.C. QTL mapping and analysis of epistatic interactions for grain yield and yield-related traits in *Triticum turgidum* L. var. *durum*. *Euphytica.* 2017;213(12):277. DOI 10.1007/s10681-017-2058-2.

- Royo C., Nachit M.M., Di Fonzo N., Araus J.L., Pfeiffer W.H., Stäfer G.A. (Eds.). *Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies*. Binghamton, NY: Food Products Press, 2005.
- Singh A.K., Chaurasia S., Kumar S., Singh R., Kumari J., Yadav M.C., Singh N., Gaba S., Jacob S.R. Identification, analysis and development of salt responsive candidate gene based SSR markers in wheat. *BMC Plant Biol.* 2018;18(1):249. DOI 10.1186/s12870-018-1476-1.
- Slim A., Piarulli L., Chennaoui Kourda H., Rouaissi M., Robbana C., Chaabane R., Pignone D., Montemurro C., Mangini G. Genetic structure analysis of a collection of Tunisian durum wheat germplasm. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(13):3362. DOI 10.3390/ijms20133362.
- Song Q.J., Shi J.R., Singh S., Fickus E.W., Costa J.M., Lewis J., Gill B.S., Ward R., Cregan P.B. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110(3):550-560. DOI 10.1007/s00122-004-1871-x.
- Turuspekov Y., Plieske J., Ganal M., Akhunov E., Abugalieva S. Phylogenetic analysis of wheat cultivars in Kazakhstan based on the wheat 90 K single nucleotide polymorphism array. *Plant Genet. Resour.* 2015;15(01):29-35. DOI 10.1017/s1479262115000325.
- Vieira M.L.C., Santini L., Diniz A.L., Munhoz C. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 2016;39(3):312-328. DOI 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- Vinod C.G., Sharma J.B., Prabhu K.V. Inheritance and molecular mapping of leaf rust resistance in *Triticum turgidum* var. *durum* cv. Trinakria. *Indian J. Genet.* 2014;74(1):10-15. DOI 10.5958/j.0975-6906.74.1.002.
- Wang H., Wang X., Chen P., Liu D. Assessment of genetic diversity of Yunnan, Tibetan, and Xinjiang wheat using SSR markers. *J. Genet. Genom.* 2007;34(7):623-633. DOI 10.1016/S1673-8527(07)60071-X.
- Yildirim A., Sönmezoğlu Öz., Gökmen S., Kandemir N., Aydın N. Determination of genetic diversity among Turkish durum wheat landraces by microsatellites. *Afr. J. Biotechnol.* 2011;10(19):3915-3920. DOI 10.5897/AJB10.2240.
- Zaïm M., El Hassouni Kh., Gamba F., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Sourour A., Amri A., Nachit M., Taghouti M., Bassi F.M. Wide crosses of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) reveal good disease resistance, yield stability, and industrial quality across Mediterranean sites. *Field Crops Res.* 2017;214:219-227. DOI 10.1016/j.fcr.2017.09.007.
- Zhang B., Shi W., Li W., Chang Xi, Jing R. Efficacy of pyramiding elite alleles for dynamic development of plant height in common wheat. *Mol. Breed.* 2013;32:327-338. DOI 10.1007/s11032-013-9873-5.

ORCID ID

A. Zatybekov [orcig.org/0000-0003-4310-5753](https://orcid.org/0000-0003-4310-5753)
S. Anuarbek [orcig.org/0000-0002-8673-9820](https://orcid.org/0000-0002-8673-9820)
S. Abugalieva [orcig.org/0000-0002-9748-507X](https://orcid.org/0000-0002-9748-507X)
Y. Turuspekov [orcig.org/0000-0001-8590-1745](https://orcid.org/0000-0001-8590-1745)

Acknowledgements. This work was carried out as a part of the project AP05131328 "QTL mapping of economically valuable traits of durum wheat *Triticum durum* Desf. based on the genome-wide association study" supported by the Ministry of Education and Science of Republic of Kazakhstan for 2018–2020.


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

Received July 1, 2020. Revised August 25, 2020. Accepted August 26, 2020.

Генетическое разнообразие *Raphanus sativus* L. коллекции ВИР по алюмоустойчивости

А.Б. Курина , И.А. Косарева, А.М. Артемьева

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

 e-mail: nastya_n11@mail.ru


Аннотация. Редис и редька (*Raphanus sativus* L.) – популярные и широко возделываемые в мире корнеплодные овощные культуры, которые занимают важное место в питании человека. На их продуктивность и качество существенное влияние оказывают эдафические стрессоры. Основным фактором, определяющим фитотоксичность кислых почв, служит повышенная концентрация подвижных ионов алюминия в почвенном растворе. Аккумуляция алюминия в тканях корня нарушает процессы деления клеток, инициации и роста боковых корней, снабжения растения минеральными веществами и водой. Изучение внутривидовой изменчивости по алюмоустойчивости *R. sativus* является важным этапом в селекции этих культур. Цель настоящего исследования заключалась в изучении генетического разнообразия культур *R. sativus* на примере 109 образцов редиса и редьки различного эколого-географического происхождения, принадлежащих 23 сортотипам, 14 разновидностям европейского, китайского и японского подвидов, по признаку устойчивости к токсическому действию ионов алюминия. При отсутствии специализированной для вида методики экспресс-оценки взят метод оценки алюмоустойчивости с использованием эриохромцианинового красителя, разработанный для зерновых культур, в основе которого лежит учет степени восстановления митотической активности корней проростков, подвергнутых шоковому воздействию повышенных концентраций алюминия. Выявлено влияние различных концентраций на жизнедеятельность растений: концентрация хлорида алюминия 66 мМ оказывала слабое токсическое действие на образцы *R. sativus*, замедляя отрастание корней; концентрация 83 мМ оказалась в высокой степени дифференцирующей для редиса и в меньшей – для редьки; концентрация 99 мМ полностью ингибировала дальнейший рост корней у 13.0 % образцов редиса и 7.3 % редьки и обладала высоко повреждающим эффектом. Концентрация $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 99 мМ позволила выделить наиболее высокотолерантные образцы редиса и редьки, которые происходят из стран с широким распространением кислых почв. В результате исследований широкого разнообразия мировой коллекции определена внутривидовая изменчивость редиса и редьки на ранних этапах вегетации и идентифицированы контрастные по устойчивости к алюминию генотипы. Мы рекомендуем концентрацию 83 мМ $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ для скрининга алюмоустойчивости образцов редиса, а концентрацию 99 мМ – для образцов редьки. Разработанный нами модифицированный метод предлагается в качестве экспресс-диагностики алюмотолерантности для быстрого скрининга широкого спектра генотипов *R. sativus* и последующего изучения контрастных форм при более длительном выращивании растений в гидропонной культуре (включая элементный анализ корней и побегов, контрастных по устойчивости образцов), а также реакций растений в почвенных условиях. Ключевые слова: коллекция редиса и редьки; генетическое разнообразие; кислые почвы; эриохромцианин; ранняя диагностика; алюмоустойчивость.

Для цитирования: Курина А.Б., Косарева И.А., Артемьева А.М. Генетическое разнообразие *Raphanus sativus* L. коллекции ВИР по алюмоустойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):613-624. DOI 10.18699/VJ20.655

Genetic diversity of VIR *Raphanus sativus* L. collections on aluminum tolerance

A.B. Kurina , I.A. Kosareva, A.M. Artemyeva

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

 e-mail: nastya_n11@mail.ru

Abstract. Radish and small radish (*Raphanus sativus* L.) are popular and widely cultivated root vegetables in the world, which occupy an important place in human nutrition. Edaphic stressors have a significant impact on their productivity and quality. The main factor determining the phytotoxicity of acidic soils is the increased concentration of mobile aluminum ions in the soil solution. The accumulation of aluminum in root tissues disrupts the processes of cell division, initiation and growth of the lateral roots, the supply of plants with minerals and water. The study of intraspecific variation in aluminum resistance of *R. sativus* is an important stage for the breeding of these crops. The purpose of this work was to study the genetic diversity of *R. sativus* crops including 109 accessions of small radish and radish of various ecological and geographical origin, belonging to 23 types, 14 varieties of European, Chinese

and Japanese subspecies on aluminum tolerance. In the absence of a rapid assessment methodology specialized for the species studied, a method is used to assess the aluminum resistance of cereals using an eriochrome cyanine R dye, which is based on the recovery or absence of restoration of mitotic activity of the seedlings roots subjected to shock exposure to aluminum. The effect of various concentrations on the vital activity of plants was revealed: a 66-mM concentration of $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ had a weak toxic effect on *R. sativus* accessions slowing down root growth; 83 mM contributed to a large differentiation of the small radish accessions and to a lesser extent for radish; 99 mM inhibited further root growth in 13.0 % of small radish accessions and in 7.3 % of radish and had a highly damaging effect. $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ at a concentration of 99 mM allowed us to identify the most tolerant small radish and radish accessions that originate from countries with a wide distribution of acidic soils. In a result, it was possible to determine the intraspecific variability of small radish and radish plants in the early stages of vegetation and to identify genotypes that are contrasting in their resistance to aluminum. We recommend the $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ concentration of 83 mM for screening the aluminum resistance of small radish and 99 mM for radish. The modified method that we developed is proposed as a rapid diagnosis of aluminum tolerance for the screening of a wide range of *R. sativus* genotypes and a subsequent study of contrasting forms during a longer cultivation of plants in hydroponic culture (including elemental analysis of roots and shoots, contrasting in resistance of accessions) as well as reactions of plants in soil conditions.

Key words: radish and small radish; collection; genetic diversity; acidic soils; eriochrome cyanine R; early diagnosis; aluminum resistance.

For citation: Kurina A.B., Kosareva I.A., Artemyeva A.M. Genetic diversity of VIR *Raphanus sativus* L. collections on aluminum tolerance. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6): 613-624. DOI 10.18699/VJ20.655

Введение

Алюминий – один из наиболее распространенных металлов в земной коре (Fitzpatrick, 1986; Kochian et al., 2015), считается нетоксичным для растений при нейтральной или слабощелочной реакции почвенного раствора. Природные процессы или деятельность человека могут привести к повышению кислотности почвы, в результате чего растворимость алюминия повышается и увеличивается содержание его подвижных форм (Al^{3+}) (Lin-Tong et al., 2013), что делает алюминий основным токсическим фактором кислых почв (Климашевский, 1991; Kochian et al., 2004). Кислые почвы в мире составляют 30–40 % площадей пахотных земель и до 70 % земель, которые потенциально могут использоваться как пахотные (Суховеркова, 2015). В России в 2019 г. из 50 млн га избыточно кислых почв сильно- и среднекислыми было занято от 25 до 35 млн га, или около 30 % от всех пахотных земель (Воробьев, 2019).

Токсичность ионов Al^{3+} снижает урожайность, препятствуя росту корней и влияя на поглощение воды и питательных веществ. В ряде исследований описаны симптомы отравления алюминием, связанные с нарушениями проницаемости клеточной стенки, плазматической мембраны, функций митохондрий, цитоскелета и ядра (McNeilly, 1982; Roy et al., 1988; Aniol, 1997; Kabata-Pendias, 2010). Таким образом, алюминий оказывает влияние на некоторые клеточные процессы, включая скорость деления клеток, и нарушает свойства протоплазмы и клеточных стенок.

По отношению к алюмотоксичности растения подразделяют на устойчивые и чувствительные, причем сортовые различия могут быть сильнее, чем видовые (Hanson, Kamprath, 1979; Климашевский, 1991). В ходе эволюционного процесса растения выработали несколько механизмов устойчивости к алюминию (Kochian et al., 2005, 2015; Ma, 2007; Ma et al., 2014). Последние годы активно изучается молекулярный механизм толерантности к алюминию сельскохозяйственных культур, прежде всего злаковых (Liu et al., 2014; Ma et al., 2014; Kochian et al., 2015). Достигнут

существенный прогресс в понимании физиологических и молекулярных механизмов толерантности к алюминию у арабидопсиса (Hoekenga et al., 2006), рапса (Ligaba et al., 2006), кукурузы (Ligaba et al., 2012), сои (Peng et al., 2018), риса (Huang et al., 2012; Che et al., 2018), сорго (Huang et al., 2018; Melo et al., 2019), ржи (Collins et al., 2008; Yokosho et al., 2010) и пшеницы (Gruber et al., 2010; Wang et al., 2015).

В настоящее время алюмоустойчивость рассматривается как сложная фитоэкологическая проблема, от решения которой зависит получение гарантированных урожаев на кислых почвах. Идентификация генов и механизмов толерантности к алюминию делает возможным селекцию Al -толерантных видов и сортов сельскохозяйственных культур с помощью молекулярного и трансгенного подходов (Delhaize et al., 2004; Magalhaes et al., 2007; Pereira et al., 2010).

Основным критическим параметром успешного создания устойчивых к стрессовым факторам сортов является изначальное генетическое разнообразие исходного материала по этому показателю как материала для отбора (Лисицын, Амунова, 2014). Получение устойчивых к алюминию сортов изученных сельскохозяйственных растений базируется на значительной вариабельности признака алюмотолерантности и сравнительно несложных схемах скрининга и селекции (Баталова, Лисицын, 2002; Косарева, 2012). Поиск генотипов со сравнительно высокой толерантностью к Al имеет большое значение для ведения сельского хозяйства на кислых почвах.

Редька и редис относятся к виду *Raphanus sativus* L., для которого известны два первичных географических центра происхождения – Средиземноморский и Азиатский (Вавилов, 1965), при этом последний в классификации М.А. Шебалиной и Л.В. Сазоновой (1985) был разделен на вторичные центры: Юго-западноазиатский, Восточноазиатский, Южноазиатский тропический. Редис – это мутантная форма редьки. Искусственный отбор проводился по признаку карликовости растений вегетативного периода онтогенеза; при этом растения репродуктивного перио-

да практически не отличаются по структуре и размерам от редьки. Процессы мутагенеза у *R. sativus* обусловлены климатическими условиями мест происхождения культурных форм. Возделывание редьки началось 4–3 тыс. лет до н. э., редис был введен в культуру намного позднее – первые сведения о нем появились в Италии в начале XVI в.

Сорта редиса отнесены к 6 ботаническим разновидностям и 16 сортотипам, редьки – к 14 разновидностям и 20 сортотипам, различающимся по комплексу морфологических, фенологических, физиологических, биохимических и хозяйственно ценных признаков. Редис и редька – популярные и широко возделываемые во всем мире корнеплодные овощные культуры, которые занимают важное место в питании человека благодаря своей высокой продуктивности, технологичности, хорошим вкусовым качествам и ценному биохимическому составу.

Для роста и развития редиса и редьки наиболее благоприятна нейтральная реакция почвенного раствора (рН 6.0–8.0). Особенно чувствительны растения к пониженной кислотности в начальные периоды роста. Большая часть посевов редиса и редьки в мире находится на территории, занятой кислыми почвами, и алюмотоксичность, безусловно, вносит негативный вклад в снижение продуктивности и качества этих культур. Поэтому современным сортам, наряду с признаками высокой урожайности, устойчивости к патогенам, технологичности и др., необходимо придать толерантность к Al. Первым этапом в таких исследованиях должен быть поиск в генофонде *R. sativus* форм, устойчивых к алюминию в условиях кислой среды.

Для оценки степени устойчивости растений к алюминию используют несколько методов диагностики (Косарева и др., 1995). Часто применяют лабораторные методики скрининга, в основе которых лежат различные модификации методов проращивания семян в водной культуре в присутствии токсичных концентраций алюминия (Foy, 1996; Лисицын, 1999; Gupta, Gaurav, 2014). Преимущество таких методик заключается в простоте исполнения, небольших временных затратах, высокой пропускной способности, возможности диагностировать генотипы на ранних этапах онтогенеза. В ряде работ выявлена достаточно высокая корреляция ($r = 0.71 \dots 0.85$) результатов лабораторных оценок устойчивости на ранних этапах развития с данными полевых и вегетационных испытаний взрослых растений (Aniol, 1981; Климашевский, 1991; Vaier et al., 1995; Burba et al., 1995).

В лабораторных тестах устойчивость растений можно оценивать по степени повреждения корней проростков алюминием с помощью красителей – гематоксилина (Cancado et al., 1999) и эриохромцианина R (Aniol, 1981). Указанный подход был успешно применен с гематоксилином для оценки внутривидовой изменчивости алюмотолерантности у риса (Awasthi et al., 2017), гороха, кукурузы, пшеницы и сорго (Anas, Yoshida, 2004; Косарева, 2012; Вишнякова и др., 2015), а с эриохромцианином R – у пшеницы, ржи, тритикале (Aniol, 1981; Aniol, Gustafson, 1984), эгилопса, овса, кукурузы (Косарева, Семенова, 2004; Косарева, 2012) и гороха (Вишнякова и др., 2015).

Исследований устойчивости корнеплодных культур *R. sativus* к алюминию практически не проводилось. В ра-

боте (Zhang, Zhou, 2005) изучалось токсикологическое воздействие коагулянтов на основе алюминия на различные культуры, в том числе на отдельные генотипы редьки. Л.Г. Соколова с коллегами (Sokolova et al., 2019) отмечали, что масличная редька (*Raphanus sativus* var. *oleifera* Metzg.) обладает наибольшим потенциалом для фитоэкстракции фторидов из загрязненных почв. J. Raj и L.R. Jeeyanthi (2014), изучавшие влияние хлорида алюминия на всхожесть семян *R. sativus*, выявили, что максимально допустимый предел Al для сохранения жизнеспособности составляет 10 мМ. Таким образом, важным этапом в селекции культур *R. sativus* с высокой устойчивостью к стрессору является широкое изучение естественной внутривидовой изменчивости алюмоустойчивости.

Цель настоящего исследования – изучение генетического разнообразия вида *R. sativus* мировой коллекции ВИР по признаку алюмотолерантности. В задачи входило: определение токсической концентрации водного хлорида алюминия ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), дифференцирующей образцы редиса и редьки по степени алюмоустойчивости; выявление наиболее устойчивых генотипов; определение их ботанической, агробиологической и географической приуроченности.

Материалы и методы

Объект исследований – стержневые коллекции редиса и редьки ВИР, состоящие из образцов различного эколого-географического происхождения и наиболее полно характеризующие разнообразие вида.

Изуемая коллекция редиса представлена 54 образцами из 25 стран, принадлежащими 13 сортотипам, 6 разновидностям европейского и китайского подвидов. Коллекция редьки представлена 55 образцами из 17 стран, принадлежащими к 10 сортотипам, 8 разновидностям европейского, китайского и японского подвидов (см. таблицу).

При отсутствии специализированной для вида методики экспресс-оценки взят метод оценки алюмоустойчивости с использованием эриохромцианинового красителя, разработанный для зерновых культур (Aniol, 1981). В основе метода лежит учет степени восстановления (или отсутствия восстановления) митотической активности корней проростков, подвергнутых шоковому воздействию повышенных концентраций алюминия.

Эксперименты проводили в климатической камере с освещенностью 7000 лк, температурой 19–21 °С и фотопериодом 16 ч. Семена (по 50 шт. каждого образца) раскладывали в специальные кюветы с ячейками для семян и сетчатым дном, которые помещали в 6-литровые контейнеры, располагая их на поверхности питательного раствора. Питательный раствор содержал (мМ): 0.4 $CaCl_2$, 0.4 KNO_3 , 0.25 $MgCl_2$, 0.01 $(NH_4)_2SO_4$, 0.04 NH_4NO_3 ; рН 4.2 (Aniol, Gustafson, 1984). После проращивания семян в течение трех суток выбраковывали невсхожие. Затем кюветы с проростками помещали в свежеприготовленный питательный раствор с добавлением 6-водного хлорида алюминия ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) и инкубировали 24 ч.

Поскольку в специальной литературе нет описаний алюмоустойчивости культур *R. sativus*, то на основании предварительных экспериментов мы использовали концентрации $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 66, 83 и 99 мМ, которые оказы-

Характеристика образцов *R. sativus* по длине отрастания корня (см) при различных концентрациях хлорида алюминия

№ п/п	Номер каталога	Название	Происхождение	Концентрация хлорида алюминия, мМ		
				66	83	99
Редис						
1	551	Красный	Турция	1.40 ± 0.12*	0.50 ± 0.05	0.35 ± 0.04
2	1233	Дунганский	Китай	0.71 ± 0.10	0.65 ± 0.10	0.23 ± 0.02
3	1543	РБК	Россия	1.40 ± 0.12	1.20 ± 0.13	0.29 ± 0.05
4	1546	Московский паровой	»	1.70 ± 0.15	1.35 ± 0.12	0.00
5	1666	Вировский белый	»	2.20 ± 0.08	1.50 ± 0.07	1.45 ± 0.03
6	1667	Красный великан	»	1.15 ± 0.11	0.89 ± 0.13	0.38 ± 0.01
7	1703	Pernot retek	Венгрия	0.42 ± 0.06	0.20 ± 0.03	0.02 ± 0.02
8	1762	Ohlsens Enke	Дания	1.41 ± 0.10	1.30 ± 0.12	0.01 ± 0.02
9	1776	Без названия	Китай	1.41 ± 0.07	0.72 ± 0.11	0.00
10	1879	Long scarlet	Индия	0.81 ± 0.09	0.50 ± 0.08	0.00
11	1923	Местный	Китай	2.05 ± 0.15	1.30 ± 0.09	0.39 ± 0.07
12	1925	Scarlet globe	Канада	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.00
13	1939	French Breakfast	Пакистан	0.90 ± 0.06	0.75 ± 0.09	0.00
14	1941	Cavalier bright scarlet	Канада	0.58 ± 0.09	0.20 ± 0.10	0.01 ± 0.01
15	1946	Дарози сурх местный	Таджикистан	1.80 ± 0.09	0.35 ± 0.06	0.45 ± 0.08
16	2083	Saxa	Чили	0.42 ± 0.09	1.04 ± 0.09	0.95 ± 0.03
17	2087	White Icicle	»	2.20 ± 0.10	0.70 ± 0.08	0.75 ± 0.07
18	2100	Bartender Red	»	1.25 ± 0.08	1.08 ± 0.05	0.85 ± 0.06
19	2105	Long Scarlet	»	1.35 ± 0.08	1.05 ± 0.06	0.76 ± 0.06
20	2106	White globe Hailstone	»	0.96 ± 0.07	0.35 ± 0.08	0.28 ± 0.08
21	2111	Champion	»	1.25 ± 0.07	0.90 ± 0.07	0.91 ± 0.06
22	2120	Местный	Турция	0.75 ± 0.18	1.45 ± 0.10	0.02 ± 0.02
23	2130	Местный	Азербайджан	1.70 ± 0.13	0.51 ± 0.05	0.50 ± 0.09
24	2133	Cherry Belle	Танзания	1.85 ± 0.23	1.23 ± 0.08	0.40 ± 0.05
25	2136	Balady	Венгрия	0.65 ± 0.07	0.79 ± 0.06	0.45 ± 0.04
26	2141	Местный	Иран	1.87 ± 0.14	0.50 ± 0.01	0.32 ± 0.08
27	2156	National	Алжир	1.35 ± 0.12	0.79 ± 0.11	0.00
28	2168	Gaudry	Нидерланды	1.25 ± 0.12	0.97 ± 0.06	0.75 ± 0.05
29	2175	Pernot OJO/52	Швеция	0.80 ± 0.08	0.90 ± 0.05	0.60 ± 0.04
30	2187	Местный	Азербайджан	1.20 ± 0.09	0.79 ± 0.05	0.69 ± 0.06
31	2188	Candela di ghiaccio	Италия	1.01 ± 0.10	0.86 ± 0.09	0.40 ± 0.04
32	2192	Vetomag	Венгрия	1.20 ± 0.10	0.86 ± 0.06	0.74 ± 0.04
33	2196	Местный	Ливан	1.00 ± 0.10	0.65 ± 0.10	0.10 ± 0.01
34	2197	De Pontvil	Франция	0.65 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.21 ± 0.03
35	2200	Местный	Сирия	1.95 ± 0.10	1.29 ± 0.09	0.92 ± 0.06
36	2210	Саратовский	Россия	1.20 ± 0.07	0.65 ± 0.05	0.01 ± 0.10
37	2217	Местный	Афганистан	1.60 ± 0.14	0.76 ± 0.12	0.29 ± 0.06
38	2222	Janosnapi	Венгрия	2.65 ± 0.08	1.20 ± 0.07	1.15 ± 0.05
39	2231	Vates'long scarlet	Эфиопия	0.55 ± 0.05	0.55 ± 0.05	0.08 ± 0.02
40	2234	Sermino	Франция	1.25 ± 0.10	0.60 ± 0.05	0.46 ± 0.04
41	2239	Eroica	Нидерланды	1.46 ± 0.08	0.95 ± 0.06	0.75 ± 0.05
42	2245	Местный	Аргентина	1.40 ± 0.25	0.51 ± 0.06	0.00
43	2260	Местный	Россия	1.56 ± 0.03	1.25 ± 0.01	1.00 ± 0.08
44	2302	Long rouge arabe	Ливия	1.10 ± 0.05	0.75 ± 0.06	0.60 ± 0.05
45	2343	Saxa	Исландия	1.51 ± 0.17	1.30 ± 0.12	0.55 ± 0.05
46	2347	Syla	Дания	1.20 ± 0.08	0.45 ± 0.09	0.12 ± 0.02
47	2360	Helios	Чехия	0.93 ± 0.05	1.00 ± 0.01	0.60 ± 0.06
48	2366	Pernot	Франция	0.36 ± 0.03	0.49 ± 0.06	0.61 ± 0.04
49	2371	Safir	Дания	1.45 ± 0.10	0.85 ± 0.05	0.56 ± 0.03
50	2379	Без названия	Ливан	1.50 ± 0.09	0.60 ± 0.09	0.58 ± 0.02
51	2383	Jegcsap	Венгрия	1.40 ± 0.13	0.65 ± 0.05	0.50 ± 0.07
52	2393	Crimson Giant	Канада	0.90 ± 0.09	0.71 ± 0.06	0.60 ± 0.04
53	2402	Rabanito	Аргентина	1.84 ± 0.22	1.03 ± 0.08	0.67 ± 0.01
54	2408	Notar	Нидерланды	1.25 ± 0.08	0.85 ± 0.07	0.47 ± 0.03
X _{ср} по коллекции				1.25 ± 0.53	0.81 ± 0.34	0.44 ± 0.35
НСР ₀₅				0.28	0.18	0.19

Окончание таблицы

№ п/п	Номер каталога	Название	Происхождение	Концентрация хлорида алюминия, мМ		
				66	83	99
Редька						
55	1675	Белая аджарская	Белоруссия	1.70±0.17	1.22±0.02	0.38±0.03
56	1778	Зимняя круглая черная	Германия	1.85±0.21	1.35±0.15	0.98±0.05
57	1805	Без названия	Узбекистан	2.25±0.25	0.71±0.11	0.46±0.06
58	1816	Белозеленая	Казахстан	2.25±0.13	1.15±0.16	1.25±0.11
59	1857	Чан шуй лобо	Китай	2.20±0.20	1.40±0.14	0.70±0.12
60	1865	Вэй сянь	»	2.88±0.25	1.20±0.08	0.00
61	1891	Анбенму	Южная Корея	1.20±0.09	1.11±0.04	0.55±0.05
62	1892	Darwish ali	Египет	1.37±0.07	0.85±0.07	0.49±0.07
63	1895	Хун-дын-лун	Китай	0.38±0.04	0.85±0.05	0.43±0.11
64	1902	Белая зеленоголовая	»	1.65±0.20	1.50±0.18	0.00
65	1903	Красная	»	1.09±0.12	0.65±0.06	0.35±0.03
66	1906	Red ball of changchou	»	1.35±0.16	0.97±0.06	0.78±0.06
67	1913	Лоба	Южная Корея	2.13±0.18	0.75±0.06	0.80±0.10
68	1914	Зимняя круглая белая	Россия	1.21±0.13	0.80±0.07	0.35±0.06
69	1935	Nezima pointed rooted	Япония	2.10±0.17	1.20±0.09	0.90±0.10
70	1942	Wase sakurajima	»	1.65±0.14	1.70±0.23	1.00±0.13
71	1958	Hakata haruwaka	»	2.70±0.06	2.25±0.11	1.45±0.03
72	1967	Местная	Афганистан	1.68±0.18	1.21±0.06	0.78±0.13
73	1978	Местная	Киргизия	2.38±0.15	0.89±0.03	0.71±0.19
74	1983	Нежная	Россия	2.08±0.02	1.26±0.23	0.92±0.06
75	2000	Местная	Узбекистан	2.50±0.41	1.29±0.08	0.66±0.08
76	2012	Runder swarzer	Германия	1.90±0.15	1.60±0.33	1.09±0.11
77	2014	Местная	Ирак	1.65±0.15	0.98±0.05	0.65±0.07
78	2021	Местная	Казахстан	0.89±0.09	0.98±0.08	0.61±0.04
79	2025	Сквиловская белая	Украина	0.56±0.09	1.45±0.19	0.87±0.12
80	2033	Turpir	Япония	0.90±0.04	0.86±0.10	0.90±0.14
81	2034	Миясигэ оонага	»	1.75±0.17	1.00±0.05	0.86±0.07
82	2074	Местная	Египет	3.05±0.21	1.56±0.09	1.13±0.09
83	2084	Round black spanish	США	1.85±0.18	1.95±0.15	1.10±0.06
84	2101	Chinese white winter	Чили	2.07±0.15	1.55±0.12	1.00±0.09
85	2111	Минотоки 2	Япония	2.46±0.10	1.75±0.12	1.16±0.06
86	2112	Саката тэнсюн	»	1.95±0.13	1.65±0.17	0.80±0.09
87	2115	Черная	Россия	1.25±0.09	1.13±0.11	0.50±0.11
88	2122	Vai cu	Вьетнам	1.85±0.24	0.95±0.05	1.10±0.04
89	2124	Без названия	Турция	1.67±0.15	1.66±0.17	0.96±0.15
90	2128	Haruysi 360	Япония	2.20±0.16	1.79±0.16	1.20±0.07
91	2133	Eifuku	»	1.25±0.14	0.75±0.03	0.00
92	2134	Eifuku 2	»	2.15±0.15	0.46±0.05	0.56±0.08
93	2148	Местная	Казахстан	1.80±0.13	1.40±0.10	1.05±0.06
94	2151	Altari mu	Южная Корея	1.16±0.08	1.30±0.10	0.87±0.07
95	2155	Местная	Япония	1.75±0.07	1.30±0.33	1.09±0.12
96	2156	Лебидка	Украина	1.58±0.02	0.48±0.01	0.00
97	2157	Нацу сакари	Япония	1.91±0.13	2.00±0.29	0.91±0.09
98	2158	Синсюу дзи	»	2.41±0.14	1.70±0.09	0.96±0.07
99	2159	Ясато рисо	»	2.40±0.23	1.75±0.13	1.19±0.06
100	2160	Акасудзи	»	2.65±0.17	1.80±0.11	1.45±0.12
101	2161	Хариоу	»	2.75±0.16	1.85±0.24	1.37±0.04
102	2163	Майская белая	Россия	1.75±0.20	0.75±0.09	0.45±0.14
103	2170	Nongwoo iljin	Южная Корея	3.00±0.19	1.80±0.09	1.27±0.01
104	2173	Jangsu	»	2.60±0.14	1.90±0.24	1.30±0.02
105	2175	Sodam	»	1.50±0.20	1.05±0.08	1.10±0.07
106	2177	Back ok	»	2.30±0.24	1.65±0.13	0.95±0.05
107	2178	Shinmyeong	»	2.60±0.20	1.49±0.10	0.55±0.07
108	2183	Гасцинец	Белоруссия	2.75±0.24	2.15±0.11	1.16±0.10
109	2184	Cheng sugeng zung	Южная Корея	2.25±0.21	1.11±0.07	1.05±0.06
X _{ср} по коллекции				1.91±0.62	1.30±0.46	0.82±0.38
HCP ₀₅				0.33	0.23	0.20

* MEAN ± SD.

вали токсичное действие на растения и в разной степени ингибировали рост корней в заданных условиях. После этого кюветы помещали в свежий питательный раствор без алюминия и инкубировали 48 ч. В течение указанного времени в корнях происходили репарационные процессы (восстановление митотической активности клеток) и корни отрастали. Проростки промывали проточной водой и производили окрашивание корней, погружая кюветы в 0.1 % раствор эриохромцианина R на 10 мин. Излишки красителя смывали проточной водой, и корни осушали фильтровальной бумагой. Зона повреждения тканей корней алюминием окрашивалась в фиолетовый цвет после применения эриохромцианина R. Устойчивость растений к алюминию определяли по длине отрастания кончика корня. Для каждого образца были проведены два независимых эксперимента в двукратной повторности.

Статистическую обработку данных выполняли методом дисперсионного анализа с помощью программы STATISTICA v.12.0 (StatSoftInc., США), методом кластерного анализа (метод Уорда) в программе PAST (Hammer et al., 2001).

Результаты

На первом этапе изучали воздействие на редис и редьку разных концентраций алюминия. В целом результаты наших исследований показали, что избыток алюминия и водорода (низкий pH) в питательном растворе негативно влияет на рост и развитие зародышевых корней проростков редиса и редьки. При всех испытанных концентрациях $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ наблюдались существенные различия между образцами *R. sativus* по длине отрастания корня (см. таблицу).

Концентрация хлорида алюминия 66 мМ оказывала слабое токсическое действие на *R. sativus*. У большинства образцов редиса и редьки митотическая активность клеток корней проростков после шокового воздействия алюминия восстанавливалась. У 70.4 % образцов редиса и 92.7 % редьки прирост корня был довольно высок (больше 1.0 см), что свидетельствует о нормальном дальнейшем развитии. У 22.2 % образцов редиса и 5.5 % редьки отмечен средний прирост корня (0.5–1.0 см), у четырех образцов редиса и одного редьки отрастание корня было меньше 0.5 см.

При концентрации $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 83 мМ наблюдалась большая дифференциация образцов. У 29.6 % образцов редиса и 70.9 % редьки прирост корня составил больше 1.0 см, среднее отрастание (0.5–1.0 см) наблюдалось у 51.9 % редиса и 25.5 % редьки. Прирост корня менее 0.5 см отмечен у 18.5 % редиса и 3.6 % редьки.

При концентрации хлорида алюминия 99 мМ отсутствовал дальнейший рост корней у 13.0 % образцов редиса и 7.3 % редьки. Небольшой прирост корня (до 0.5 см) отмечен у 46.3 % образцов редиса и 14.5 % редьки. Отрастание корня на 0.5–1.0 см наблюдалось у 33.3 % образцов редиса и 41.8 % редьки. Нормальный рост корня после воздействия данной концентрации токсиканта отмечен лишь для 7.4 % образцов редиса и 36.4 % редьки.

Таким образом, при разной напряженности стрессора наиболее четко проявлялись различия между образцами редиса при концентрации хлорида Al 83 мМ, между об-

разцами редьки – при концентрации 99 мМ. Для дальнейшей оценки полиморфизма мы использовали эти концентрации, так как их негативное воздействие выявило максимальную дифференцирующую способность.

Образцы с минимальной длиной отрастания корня характеризовались интенсивной фиолетовой окраской участков корешков, выросших при добавлении подвижного алюминия, а образцы с максимальной длиной отрастания корня имели слабое, но детектируемое окрашивание (рис. 1).

По длине отрастания корня образцы редиса и редьки в зависимости от концентрации алюминия разделились на несколько статистически достоверных групп (рис. 2). При концентрации 66 мМ образцы редиса и редьки характеризовались широким диапазоном прироста корня – 0.15–2.65 и 0.38–3.05 см, такая изменчивость разделила образцы на семь и восемь групп соответственно.

При концентрации 83 мМ образцы редиса разделились на четыре группы с диапазоном изменчивости от 0.20 до 1.50 см. В первую группу вошли 5 образцов розово-красной разновидности из Канады и Венгрии с отрастанием корня менее 0.40 см. Вторая группа включает наибольшее количество (24) образцов, в основном из стран Малой и Средней Азии и Африки. Третья группа представлена образцами из Европы и Южной Америки различной сортотипической принадлежности. Четвертая группа объединяет 9 образцов преимущественно из России, а также из Китая, Турции, Венгрии, Исландии и Танзании с отрастанием корня более 1.20 см. Образцы редьки разделились на пять групп с диапазоном 0.46–2.25 см; при этом образцов с отрастанием корня менее 0.40 см после воздействия данной концентрации хлорида алюминия не отмечено. В первую группу с приростом корня от 0.41 до 0.80 см вошли 8 образцов из Японии, России, Китая и Узбекистана. Вторая группа представлена образцами из Средней Азии, Вьетнама, Южной Кореи, Египта и Японии. Самые крупные третья и четвертая группы с приростом корня более 1.20 см включают 31 образец из Японии, Южной Кореи, стран Европы и Средней Азии, а также из США, Чили и России. Пятая группа представлена 3 образцами из Японии и Белоруссии, у которых прирост корня был больше 2.0 см.

При концентрации 99 мМ образцы редиса, и редьки разделились на четыре группы в диапазоне от 0.00 до 1.45 см. В первую группу попали 26 образцов редиса, у 7 из которых отмечен нулевой прирост корня. Эти образцы имеют разное географическое происхождение, но преобладающая часть из Канады, России, Китая и стран Средней Азии. У редьки в первую группу вошли только 7 образцов, у 4 из них отсутствовал дальнейший рост корней; к данной группе относились образцы из Китая, Украины, Белоруссии и России. Вторую группу у редиса сформировали в основном образцы из стран Европы и Южной Америки, а также некоторые образцы из Азербайджана, Таджикистана и Ливии. У редьки во второй группе оказались образцы из России, стран Средней Азии, Китая и Южной Кореи. В третью группу у редиса вошли 6 образцов из Чили, России и Сирии, у редьки – 25 образцов преимущественно из Японии, Южной Кореи, а также из Чили, Турции, России, Германии и США. Чет-



Рис. 1. Внешний вид устойчивого (слева) и неустойчивого (справа) проростка редиса.

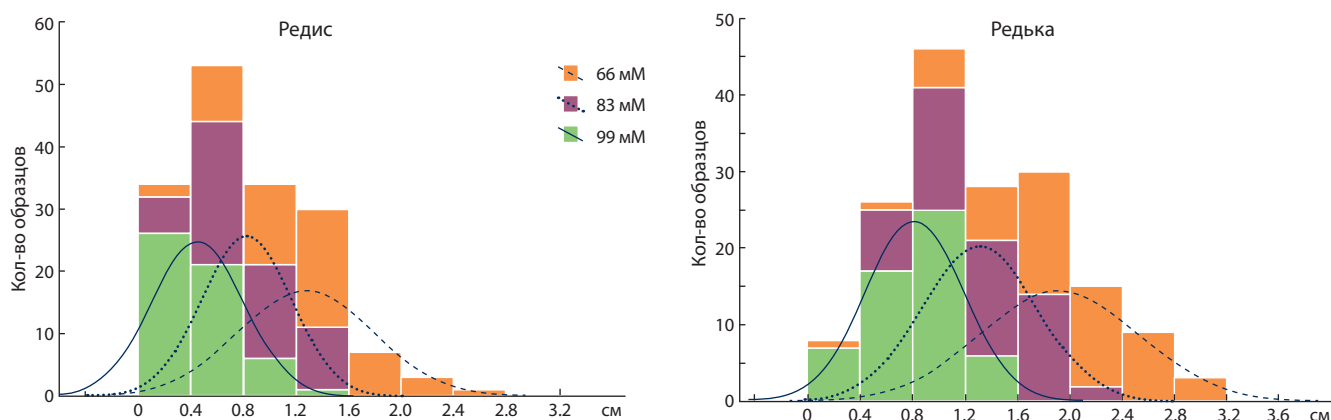


Рис. 2. Гистограмма распределения образцов редиса и редьки по длине отрастания корня при различных концентрациях хлорида алюминия.

вертая группа у редиса состоит только из одного образца из России (к-1666), у редьки в этой группе представлены 6 образцов из Японии, Южной Кореи и Казахстана.

По результатам кластерного анализа прироста корня у образцов *R. sativus* после воздействия токсических концентраций $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ построена дендрограмма (рис. 3). Образцы редиса и редьки разделились на две группы, внутри каждой из которых, в свою очередь, были выделены кластеры по степени алюмоустойчивости. Общее число кластеров составило пять: два кластера в первой группе и три – во второй.

Первый малый кластер включал образцы японской редьки из Японии и Южной Кореи и Белоруссии и образец редьки китайской из Египта, у них отмечался большой прирост корня при концентрации $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 66 мМ и относительно равный высокий при концентрациях 83 и 99 мМ. Второй кластер объединял образцы редиса и редьки с приростом корня более 1.0 см после воздействия всех трех токсических концентраций Al. Кластер разделен на два подкластера. В первом находятся образец редиса из России (к-1666, Вировский белый), образцы дайкона из Японии и Южной Кореи, два образца зимней европей-

ской редьки из Германии и США (var. *niger* (L.) Sinsk.) и образец лобы из Чили (var. *lobo*). Второй подкластер включает образцы редиса из Венгрии (var. *chloris* Alef.), Сирии (var. *rubescens* Sinsk.), Аргентины (var. *striatus* Sinsk.) и России (var. *roseus* Sazon.), образцы китайской редьки из Казахстана, Китая и Южной Кореи (var. *virens* Sazon.), Японии, России, Ирака и Афганистана (var. *rubidus* Sazon.) и образцы дайкона из Японии, Южной Кореи и Вьетнама.

В третий малый кластер объединены образцы редиса, у которых наблюдалось слабое отрастание корня или его полное отсутствие при всех используемых концентрациях. Это образцы из Франции, Пакистана (var. *striatus* Sinsk.), Канады, Венгрии, Эфиопии, Ливана (var. *rubescens* Sinsk., var. *radicula*), Китая и Индии (var. *roseus* Sazon.).

Четвертый кластер представлен образцами редиса и редьки, у которых отрастание корня после воздействия токсических концентраций 83 и 99 мМ было средним (до 1.0 см). Внутри кластера выделились три подкластера. В первый вошли образцы редиса пестрой и розово-красной разновидности, по одному образцу белой европейской и розовой китайской разновидности, лобы из Казахстана

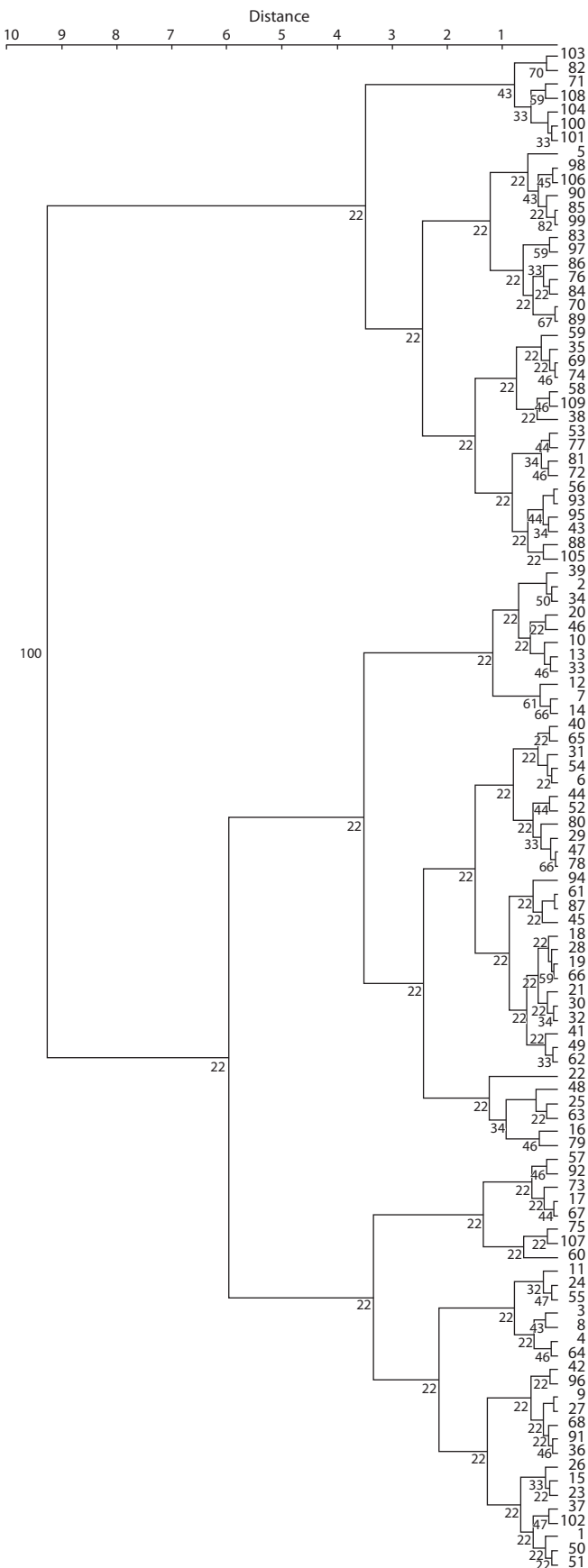


Рис. 3. Дендрограмма образцов *R. sativus* по приросту корня после воздействия разных концентраций $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. Метод Уорда.

Цифры на дендрограмме указывают величину бутстрэпа. Справа от дендрограммы даны порядковые номера образцов в соответствии с таблицей.

(var. *lobo*) и Китая (var. *roseus* Sazon.) и дайкон из Японии. Второй подкластер объединяет образцы редиса из Чили, Нидерландов, Венгрии (var. *rubescens* Sinsk.), европейской редьки из России, Египта (var. *niger* (L.) Sinsk.) и лобы из Южной Кореи (var. *lobo*) и Китая (var. *roseus* Sazon.). В третий подкластер попали образцы редиса розово-красной разновидности из Чили, Турции и Венгрии, европейской зимней редьки из Украины (var. *hybernus*) и образец розовой лобы из Китая.

Пятый кластер включает образцы редиса и редьки, у которых отмечалось частичное или полное ингибирование роста корня при концентрации 99 мМ и среднее отрастание корня при остальных концентрациях. Кластер разделен тоже на три подкластера. Первый объединяет образцы лобы среднеазиатского происхождения, дайконы из Японии и Южной Кореи и образец редиса из Чили. Второй подкластер включает в основном образцы редиса из России, Китая и Танзании и два образца редьки из Белоруссии и Китая. Третий подкластер представлен преимущественно образцами редиса среднеазиатского происхождения и несколькими образцами редьки из России и Украины.

Обсуждение

В филогенезе редьки и редиса большое значение имели генетические процессы (рекомбинации, мутации на хромосомном уровне, экспрессия неактивных генов и изменение частот аллелей, контролирующих признаки и обуславливающих фенотип растения), которые происходили при естественном и искусственном отборе в различных эколого-географических условиях (Бунин, Есикава, 1993). Большое внутривидовое разнообразие форм вида *R. sativus* при диплоидном уровне развития объясняется спонтанными генными и наследуемыми соматическими мутациями (Campbell, Snow, 2009). В наших предыдущих исследованиях выявлено, что пределы изменчивости количественных признаков – морфологических, признаков продуктивности, скороспелости, накопления питательных веществ – у редиса и редьки очень велики (Курина и др., 2017, 2018; Курина, Артемьева, 2017, 2019). Например, амплитуда варьирования важнейших признаков составляет: продолжительность периода вегетации 18–95 дней; масса корнеплода 2–75 (редис) и 150–1100 г (редька); диаметр листовой розетки 8–45 см; форма корнеплода: округло-плоская, округлая, округло-овальная, овальная, цилиндрическая, веретеновидная, коническая; содержание аскорбиновой кислоты 18–55 мг/100 г и т. д.

Согласно литературным данным, редис и редька устойчивы к действию тяжелых металлов и обладают высокой способностью накапливать тяжелые металлы в корнеплоде (Wang et al., 2012; Ngo et al., 2016; Елизарьева и др., 2017). Причем дайкон аккумулирует в корнеплодах меньше токсичных элементов, он более устойчив к загрязнению такими тяжелыми металлами, как свинец, кадмий, никель, цинк, ванадий, хром, мышьяк. Реакция дайкона на загрязнение почв имеет сортовую специфику (Горелова и др., 2005; Xu et al., 2017). Поскольку культуры *R. sativus* являются аккумуляторами тяжелых металлов, они предложены для фиторемедиации (Kumar et al., 1995; Ebbs, Kochian, 1997; Ebbs et al., 1997; Wang et al., 2012).

Также редька умеренно чувствительная к солевому стрессу овощная культура (Sun et al., 2016).

Сравнительное изучение образцов *R. sativus* по признаку алюмоустойчивости выявило высокую внутривидовую изменчивость. В целом образцы редьки оказались более устойчивы к алюмострессу, нежели образцы редиса, независимо от концентрации, что, вероятно, связано с процессами формообразования.

Группировка образцов по длине отрастания корня после воздействия различных токсических концентраций хлорида алюминия (см. рис. 2) выявила, что представители обеих культур формируют четыре группы с диапазоном отрастания корня от 0 до 1.6 см при концентрации 83 и 99 мМ. Образцы *R. sativus* слабо реагируют на малые концентрации $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, митотическая активность клеток корней проростков после шокового воздействия алюминием восстанавливалась. При повышении концентрации начинают проявляться внутривидовые различия культур. Интенсивность окрашивания эриохромцианином R характеризует концентрацию подвижных форм алюминия, что в свою очередь коррелирует с алюмотолерантностью (Вишнякова и др., 2015). Если после обработки алюминием концентрация его активных форм невелика, то в корне восстанавливается митотическая активность клеток, корень отрастает, и после зоны окрашивания появляется неокрашенный прирост (Косарева, 2012). Таким образом, интенсивность окрашивания может служить дополнительным показателем степени алюмотолерантности, связанным с концентрацией токсиканта в тканях корня.

Исходя из полученных данных, нами предложена следующая шкала устойчивости для культур *R. sativus* по признаку алюмотолерантности: отрастание корня до 0.40 см – неустойчивые; от 0.41 до 0.80 см – слабоустойчивые; от 0.81 до 1.20 см – среднеустойчивые; более 1.21 см – высокоустойчивые.

Концентрация $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 99 мМ позволила выделить наиболее толерантные образцы (по убыванию): редиса – Вировский белый (к-1666, Россия), Janosnari (к-2222, Венгрия), Местный (к-2260, Россия), редьки – Nakata haruwaka (к-1958, Япония), Акасудзи (к-2160, Япония), Хариоу (к-2161, Япония), Jangsu (к-2173, Южная Корея).

По результатам кластерного анализа, первый и второй кластер объединяют высокоустойчивые и среднеустойчивые образцы редьки и высокоустойчивые образцы редиса, в третьем кластере находятся неустойчивые и слабоустойчивые образцы редиса, в четвертом и пятом кластерах сосредоточены в основном среднеустойчивые образцы редиса и слабоустойчивые и неустойчивые образцы редьки. Слабоустойчивыми и неустойчивыми к алюмострессу оказались образцы *R. sativus* среднеазиатского происхождения (Азербайджан, Узбекистан, Афганистан и др.), а также африканского (Алжир, Эфиопия). Почвы этих стран характеризуются нейтральной или слабощелочной реакцией pH почвенного раствора, что, вероятно, и обуславливает низкую устойчивость образцов к пониженной кислотности и алюмострессу. Среднеустойчивые образцы были в основном из европейских стран (Нидерланды, Германия, Италия и др.), а также из США и Чили, где ведется активная селекция этих культур по различным направлениям. Образцы редиса и редьки из

России, Венгрии, Турции, Китая, Японии, Южной Кореи и Казахстана обладали разной степенью устойчивости; при этом образцы одного географического происхождения могли оказаться как алюмотолерантными, так и чувствительными к воздействию алюминия. Возможно, это связано с наличием как кислых, так и нейтральных/щелочных почв в перечисленных странах, а также с направлениями селекционной работы с этими культурами. Наиболее алюмотолерантными были образцы дайкона сортотипа Камейдо из Японии и сортотипа Сироагири из Южной Кореи, местные образцы зеленой лобы из Казахстана и редиса китайского подвида российской селекции, которые были получены путем отбора и гибридизации из популяции азиатских редек.

Таким образом, вид *Raphanus sativus* является полиморфным не только по фенотипическим и биохимическим признакам, но и по степени устойчивости к различным абиотическим стрессам.

Заклучение

В результате исследования выявлено, что избыточные концентрации подвижного алюминия и водорода (элементы кислых почв) в зоне корней оказывают негативный эффект на рост и развитие зародышевых корешков образцов редиса и редьки. В токсичных концентрациях водного хлорида алюминия в питательной среде образцы изученного вида характеризовались высокой вариабельностью по признаку алюмотолерантности при разной напряженности стрессора. Благодаря проведенному скринингу удалось определить внутривидовую изменчивость растений редиса и редьки на ранних этапах вегетации и идентифицировать контрастные по устойчивости к алюминию генотипы. Мы рекомендуем концентрацию 83 мМ $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ для оценки алюмоустойчивости редиса, а концентрацию 99 мМ – для оценки редьки. Разработанный нами метод предлагается в качестве экспресс-диагностики алюмотолерантности для быстрого скрининга широкого спектра генотипов *R. sativus* и последующего изучения контрастных форм при более длительном выращивании растений в гидропонной культуре (включая элементный анализ корней и побегов, контрастных по устойчивости образцов), а также реакций растений в почвенных условиях.

Список литературы / References

- Баталова Г.А., Лисицын Е.М. О селекции овса на устойчивость к эдафическому стрессу. *Селекция и семеноводство*. 2002;2:17-19. [Batalova G.A., Lisitsyn E.M. On the breeding of oats for resistance to edaphic stress. *Seleksiya i Semenovodstvo = Breeding and Seed Industry*. 2002;2:17-19. (in Russian)]
- Бунин М.С., Есикава Х. Генетические ресурсы японского подвида редьки – дайкона и его интродукция в высокоширотных регионах Евразии. *С.-х. биология*. 1993;1:19-32. [Bunin M.S., Esikawa X. Genetic resources of the Japanese radish subspecies daikon and its introduction in northern regions of Eurasia. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1993;1:19-32. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Учение о происхождении культурных растений после Дарвина. Избр. труды. Т. 5. М.; Л., 1965. [Vavilov N.I. The Doctrine of the Origin of Cultivated Plants after Darwin. Selected Works. Vol. 5. Moscow; Leningrad, 1965. (in Russian)]

- Вишнякова М.А., Семенова Е.В., Косарева И.А., Кравчук Н.Д., Лоскутов С.И., Пухальский Я.В., Шапошников А.И., Сазонова А.Л., Белимов А.А. Метод экспресс-оценки алюмотолерантности у гороха посевного (*Pisum sativum* L.). *С.-х. биология*. 2015;50(3):353-360. DOI 10.15389/agrobiology.2015.3.353rus. [Vishnyakova M.A., Semenova E.V., Kosareva I.A., Kravchuk N.D., Loskutov S.I., Puhalskii I.V., Shaposhnikov A.I., Sazonova A.L., Belimov A.A. Method for rapid assessment of aluminum tolerance of pea (*Pisum sativum* L.). *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2015;50(3):353-360. DOI 10.15389/agrobiology.2015.3.353eng.]
- Воробьев М. Известкование кислых почв в России: проблемы и актуальные подходы. 2019. <https://glavagronom.ru/articles/Izvestkovanie-kislyh-pochv-v-Rossii-problemy-i-aktualnye-podhody> [Vorob'ev M. Liming of acidic soils in Russia: problems and current approaches. 2019. Available at: <https://glavagronom.ru/articles/Izvestkovanie-kislyh-pochv-v-Rossii-problemy-i-aktualnye-podhody> (in Russian)]
- Горелова С.В., Гинс М.С., Ермакова Е.В., Песцов Г.В., Фронтасьева М.В. Сортовая специфика аккумуляции элементов из почв у дайкона. В: Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: Материалы VI Междунар. симпозиум, Пушино, 13–17 июня 2005 г. М., 2005;3:75-78. [Gorelova S.V., Gins M.S., Ermakova E.V., Pestsov G.V., Frontasieva M.V. Varietal specificity of the accumulation of elements from soils in daikon. In: New and Non-traditional Plants and Prospects for Their Use: Proceedings of the VI Int. Symp., Puschino, June 13–17, 2005. Moscow, 2005;3:75-78. (in Russian)]
- Елизарьева Е.Н., Янбаев Ю.А., Редькина Н.Н., Кудашкина Н.В., Байков А.Г., Смирнова А.П. Влияние соединений некоторых тяжелых металлов на процесс формирования проростков редиса. *Соврем. пробл. науки и образования*. 2017;6. [Elizariyeva E.N., Yanbaev Y.A., Redkina N.N., Kudashkina N.V., Baykov A.G., Smirnova A.P. Influence of some heavy metals compounds on the process of radish sprouts formation. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2017;6. (in Russian)]
- Климашевский Э.Л. Генетический аспект минерального питания растений. М., 1991. [Klimashevskiy E.L. The Genetic View of the Mineral Nutrition of Plants. Moscow, 1991. (in Russian)]
- Косарева И.А. Изучение коллекций сельскохозяйственных культур и диких родичей по признакам устойчивости к токсическим элементам кислых почв. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2012;170:35-45. [Kosareva I.A. The study of crops and wild relatives collections for signs of resistance to toxic elements of acid soils. *Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;170:35-45. (in Russian)]
- Косарева И.А., Давыдова Г.В., Семенова Е.В. Определение кислотостойкости зерновых культур: Метод. указания. СПб., 1995. [Kosareva I.A., Davydova G.V., Semenova E.V. Test of Acid Tolerance in Cereal Crops: Methodological Guidelines. St. Petersburg, 1995. (in Russian)]
- Косарева И.А., Семенова Е.В. Алюмотолерантность видов эгилопса. В: Тез. Междунар. конф. «Проблемы физиологии растений Севера». Петрозаводск, 15–18 июня 2004 г. Петрозаводск, 2004;98. [Kosareva I.A., Semenova E.V. Aluminum tolerance in *Aegilops* species. In: Int. conf. "Problems of Plant Physiology in Northern Regions". Petrozavodsk, June 15–18, 2004. Petrozavodsk, 2004;98. (in Russian)]
- Курина А.Б., Артемьева А.М. Биологические особенности редьки и редиса (*Raphanus sativus* L.) коллекции ВИР при летнем сроке выращивания в условиях Ленинградской области. *Изв. С.-Петербург. гос. аграр. ун-та*. 2017;1(46):25-31. [Kurina A.B., Artemyeva A.M. Biological features of radish and small radish (*Raphanus sativus* L.) accessions of the VIR collection during the summer growing period in the conditions of the Leningrad region. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = News of St. Petersburg State Agrarian University*. 2017;1(46):25-31. (in Russian)]
- Курина А.Б., Артемьева А.М. Признаковая коллекция *Raphanus sativus* L. ВИР. В: Сборник тезисов междунар. конф. «125 лет прикладной ботаники в России», 25–28 нояб. 2019 г. СПб., 2019; 155. DOI 10.30901/978-5-907145-39-9. [Kurina A.B., Artemyeva A.M. Trait-specific collection of *Raphanus sativus* L. at VIR. In: Book of abstracts of Int. conf. "125 Years of Applied Botany in Russia", 25–28 Nov. 2019. St. Petersburg, Russia, 2019;155. DOI 10.30901/978-5-907145-39-9. (in Russian)]
- Курина А.Б., Корнюхин Д.Л., Артемьева А.М. Генетическое разнообразие и биохимическая ценность корнеплодных овощных растений семейства Капустные (*Brassicaceae* Burnett). *Вестн. НГАУ*. 2018;4(49):81-92. DOI 10.31677/2072-6724-2018-49-4-81-92. [Kurina A.B., Korniyukhin D.L., Artemyeva A.M. Genetic diversity and biochemical value of root cabbage crops (*Brassicaceae* Burnett). *Vestnik NGAU = Bulletin of NSAU*. 2018;4(49):81-92. DOI 10.31677/2072-6724-2018-49-4-81-92. (in Russian)]
- Курина А.Б., Хмелинская Т.В., Артемьева А.М. Генетическое разнообразие корнеплодных растений *Raphanus sativus* L. (редис и редька) коллекции ВИР. *Овощи России*. 2017;5(38):9-13. DOI 10.18619/2072-9146-2017-5-9-13. [Kurina A.B., Khmelinskaya T.V., Artemyeva A.M. Genetic diversity of VIR collections of the *Raphanus sativus* L. (small radish and radish). *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2017;5(38):9-13. DOI 10.18619/2072-9146-2017-5-9-13. (in Russian)]
- Лисицын Е.М. Влияние эдафических стрессов на возможные результаты интродукции сельскохозяйственных растений. В: Интродукция сельскохозяйственных растений и ее значение для сельского хозяйства Северо-Востока России: Материалы науч.-практ. конф. Киров, 8–9 июля 1999 г. Киров, 1999;140-142. [Lisitsyn E.M. The influence of edaphic stresses on the possible results of crop introduction. In: The Introduction of Agricultural Plants and its Significance for Agriculture in the North-East of Russia: Proc. scientific and practical conf. Kirov, July 8–9, 1999. Kirov, 1999;140-142. (in Russian)]
- Лисицын Е.М., Амунова О.С. Генетическое разнообразие сортов яровой мягкой пшеницы по аллюмоустойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(3):497-505. [Lisitsyn E.M., Amunova O.S. Genetic variability of spring common wheat varieties in aluminum tolerance. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5:48-54. DOI 10.1134/S2079059715010050.]
- Суховеркова В.Е. Кислотность почвы: тенденции и борьба. *Журнал Агробизнес*. 2015;6(34):60-62. [Suhoverkova V.E. Soil acidity: trends and control. *Zhurnal Agrobiznes = Journal Agribusiness*. 2015;6(34):60-62. (in Russian)]
- Шебалина М.А., Сазонова Л.В. Культурная флора СССР. Т. 18. Корнеплодные растения. Л.: Агропромиздат, 1985. [Shebalina M.A., Sazonova L.V. The Cultural Flora of the USSR. Vol. 18. Root Plants. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]
- Anas A., Yoshida T. Heritability and genetic correlation of Al-tolerance with several agronomic characters in sorghum assessed by hematoxylin staining. *Plant Prod. Sci.* 2004;7:280-282.
- Aniol A. Metody okreslaniu tolerancinoci zboz na toksyczne dzialanie jonow glinu. *Biul. Inst. Hodowly i Klimat. Roslin*. 1981;143:3-14. (in Polish)
- Aniol A. The aluminum tolerance in wheat. In: Plant Breeding: Theories, Achievements and Problems: Proc. Int. conf. Dotnuva-Akademija, Lithuania, 1997;14-22.

- Aniol A., Gustafson P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* 1984;26(6):701-705. DOI 10.1139/g84-111.
- Awasthi J.P., Saha B., Regon P., Sahoo S., Chowra U., Pradhan A., Roy A., Panda S.K. Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. *PLoS One.* 2017;12(4). DOI 10.1371/journal.pone.0176357.
- Baier A.C., Somers D.J., Gustafson J.P. Aluminum tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breeding.* 1995;114:291-296.
- Burba U., Mackowiak W., Paizer K., Budzianowski G. Tolerancja odmian i rodow pszenzyta ozimego hodowli ZDHAR Malyszyn na niskie pH i wysokie stezenie jonow glinu. *Biul. Inst. Hodowli i Aklimat. Roslin.* 1995;195-196:131-136. (in Polish)
- Campbell L.G., Snow A.A. Can feral weeds evolve from cultivated radish (*Raphanus sativus*, Brassicaceae)? *Am. J. Bot.* 2009;96:498-506. DOI 10.3732/ajb.0800054.
- Cancado G.M.A., Martins P.R., Parentoni S.N., Oliveira A.B., Lopes M.A. Assessment of phenotypic indexes for aluminum tolerance in maize using nutrient solution. In: Proc. Plant & Animal Genome VII Conference, San Diego, CA, 1999;271.
- Che J., Tsutsui T., Yokosho K., Yamaji N., Ma J.F. Functional characterization of an aluminum (Al)-inducible transcription factor, ART2, revealed a different pathway for Al tolerance in rice. *New Phytol.* 2018;220(1):209-218. DOI 10.1111/nph.15252.
- Collins N.C., Shirley N.J., Saeed M., Pallotta M., Gustafson J.P. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics.* 2008;179(1):669-682. DOI 10.1534/genetics.107.083451.
- Delhaize E., Ryan P.R., Hebb D.M., Yamamoto Y., Sasaki T., Matsumoto H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(42):15249-15254. DOI 10.1073/pnas.0406258101.
- Ebbs S.D., Kochian L.V. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 1997;5: 776-781. DOI 10.2134/jeq1997.00472425002600030026x.
- Ebbs S.D., Lasat M.M., Brady D.J., Cornish J., Gordon R., Kochian L.V. Phytoextraction of cadmium and zinc from contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 1997;26:1424-1430. DOI 10.2134/jeq1997.00472425002600050032x.
- Fitzpatrick E.A. An Introduction to Soil Science. New York: Longman Scientific and Technical, 1986;2-55.
- Foy C.D. Tolerance of durum wheat lines to an acid, aluminum-toxic subsoil. *J. Plant Nutr.* 1996;19:1381-1394.
- Gruber B.D., Ryan P.R., Richardson A.E., Tyerman S.D., Ramesh S., Hebb D.M., Howitt S.M., Delhaize E. HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. *J. Exp. Bot.* 2010;61(5): 1455-1467. DOI 10.1093/jxb/erq023.
- Gupta N., Gaurav S.S. Aluminium toxicity and resistance in wheat genotypes. *European J. Biotechnol. Biosci.* 2014;2(4):26-29.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):4.
- Hanson W.D., Kamprath E.J. Selection for aluminum tolerance in soybeans based on seedling-root growth. *Agron. J.* 1979;71(4): 581-586.
- Hoekenga O.A., Maron L.G., Piñeros M.A., Cancado G.M.A., Shaff J., Kobayashi Y., Ryan P.R., Dong B., Delhaize E., Sasaki T., Matsumoto H., Yamamoto Y., Koyama H., Kochian L.V. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(25):9738-9743. DOI 10.1073/pnas.0602868103.
- Huang C.F., Yamaji N., Chen Z., Ma J.F. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J.* 2012;69(5):857-867. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04837.x.
- Huang S., Gao J., You J. Identification of STOP1-like proteins associated with aluminum tolerance in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Front. Plant Sci.* 2018;9:258. DOI 10.3389/fpls.2018.00258.
- Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. Fourth Edition. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. DOI 10.1201/b10158.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorus efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004;55:459-493.
- Kochian L.V., Piñeros M.A., Hoekenga O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil.* 2005;274:175-195.
- Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes J.V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015;66:571-598. DOI 10.1146/annurev-arplant-043014-114822.
- Kumar P.B., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 1995;29:1232-1238. DOI 10.1021/es00005a014.
- Ligaba A., Katsuhara M., Ryan P.R., Shibasaki M., Matsumoto H. The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* 2006;142(3):1294-1303. DOI 10.1104/pp.106.085233.
- Ligaba A., Maron L., Shaff J., Kochian L., Piñeros M. Maize *ZmALMT2* is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ.* 2012;35(7):1185-1200. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02479.x.
- Lin-Tong Y., Yi-Ping Q., Huan-Xin J., Li-Song C. Roles of organic acid anion secretion in aluminium tolerance of higher plants. *BioMed Res. Int.* 2013;16. DOI 10.1155/2013/173682.
- Liu J., Piñeros M.A., Kochian L.V. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *J. Integr. Plant Biol.* 2014; 56(3):221-230. DOI 10.1111/jipb.12162.
- Ma J.F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 2007;264:225-252. DOI 10.1016/S0074-7696(07)64005-4.
- Ma J.F., Chen Z.C., Shen R.F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant Soil.* 2014;381:1-12. DOI 10.1007/s11104-014-2073-1.
- Magalhaes J.V., Liu J., Guimaraes C.T., Lana U.G.P., Alves V.M.C., Wang Y.H., Schaffert R.E., Hoekenga O.A., Pineros M.A., Shaff J.E., Klein P.E., Carneiro N.P., Coelho C.M., Trick H.N., Kochian L.V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (*MATE*) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat. Genet.* 2007; 39(9):1156-1161.
- McNeilly N. A rapid method for screening barley for aluminum tolerance. *Euphytica.* 1982;31(1):237-239.
- Melo J.O., Martins L.G., Barros B.A., Pimenta M.R., Lana U.G., Duarte C.E., Pastina M.M., Guimaraes C.T., Schaffert R.E., Kochian L.V., Fontes E.P., Magalhaes J.V. Repeat variants for the *SbMATE* transporter protect sorghum roots from aluminum toxicity by transcriptional interplay in cis and trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(1):313-318. DOI 10.1073/pnas.1808400115.
- Ngo L.K., Pinch B.M., Bennett W.W., Teasdale P.R., Jolley D.F. Assessing the uptake of arsenic and antimony from contaminated soil by radish (*Raphanus sativus*) using DGT and selective extractions. *Environ. Pollut.* 2016;216:104-114. DOI 10.1016/j.envpol.2016.05.027.
- Peng W., Wu W., Peng J., Li J., Lin Y., Wang Y., Tian J., Sun L., Liang C., Liao H. Characterization of the soybean *GmALMT* family genes and the function of *GmALMT5* in response to phosphate starvation. *J. Integr. Plant Biol.* 2018;60:216-231. DOI 10.1111/jipb.12604.
- Pereira J.F., Zhou G., Delhaize E., Richardson T., Zhou M., Ryan P.R. Engineering greater aluminium resistance in wheat by over-express-

- ing *TaALMT1*. *Ann. Bot.* 2010;106(1):205-214. DOI 10.1093/aob/mcq058.
- Raj J., Jeyanthi L.R. Phytoremediation of aluminium and lead using *Raphanus sativus*, *Vigna radiata* and *Cicer arietinum*. *J. Chem. Pharm. Res.* 2014;6(5):1148-1152.
- Roy A.K., Sharma A., Talukder G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. *Bot. Rev.* 1988;54(2):145-178.
- Sokolova L.G., Zorina S.Y., Belousova E.N. Zonal cultivars of field crops as a reserve for the phytoremediation of fluorides polluted soils. *Int. J. Phytoremediation.* 2019;21(6):577-582. DOI 10.1080/15226514.2018.1540545.
- Sun X., Xu L., Wang Y., Luo X., Zhu X., Kinuthia K.B., Nie Sh., Feng H., Li Ch., Liu L. Transcriptome-based gene expression profiling identifies differentially expressed genes critical for salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Cell Rep.* 2016;35(2):329-346. DOI 10.1007/s00299-015-1887-5.
- Wang D., Wen F., Xu Ch., Tang Y., Luo X. The uptake of Cs and Sr from soil to radish (*Raphanus sativus* L.) – potential for phytoextraction and remediation of contaminated soils. *J. Environ. Radioact.* 2012;110:78-83. DOI 10.1016/j.jenvrad.2012.01.028.
- Wang H., Chen R.F., Iwashita T., Shen R.F., Ma J.F. Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytol.* 2015;205(1):273-279. DOI 10.1111/nph.13011.
- Xu L., Wang Y., Zhang F., Tang M., Chen Y., Wang J., Karanja B.K., Luo X., Zhang W., Liu L. Dissecting root proteome changes reveals new insight into cadmium stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Cell Physiol.* 2017;58(11):1901-1913. DOI 10.1093/pcp/pcx131.
- Yokosho K., Yamaji N., Ma J.F. Isolation and characterisation of two *MATE* genes in rye. *Funct. Plant Biol.* 2010;37(4):296-303. DOI 10.1071/FP09265.
- Zhang K., Zhou Q. Ecological toxicity of aluminum-based coagulant on representative corps in neutral environment. *J. Appl. Ecol.* 2005;16(11):2173-2177.

ORCID ID

A.B. Kurina orcid.org/0000-0002-3197-4751
I.A. Kosareva orcid.org/0000-0001-9654-7235
A.M. Artemyeva orcid.org/0000-0002-6551-5203

Благодарности. Статья подготовлена в соответствии с темой государственного задания на 2019 г. № 0662-2019-0003 «Генетические ресурсы овощных и бахчевых культур Мировой коллекции ВИР: эффективные пути расширения разнообразия, раскрытия закономерностей наследственной изменчивости, использования адаптивного потенциала», номер государственной регистрации НИОКТР (РК) по плану научно-исследовательской работы ВИР АААА-А19-11-9013090157-1.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.04.2020. После доработки 26.07.2020. Принята к публикации 26.07.2020.

Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные пути использования и селекции культуры

М.А. Вишнякова , А.В. Кушнарева, Т.В. Шеленга, Г.П. Егорова

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

 e-mail: m.vishnyakova.vir@gmail.com

Аннотация. Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.) – ценная зернобобовая культура, адаптированная к широкому спектру климатических условий и имеющая непродолжительную историю доместикиции. В течение многих веков его употребляли преимущественно как сидеральное растение, поскольку успех и перспективы многоцелевого использования вида зависят от его селекционного улучшения, в частности от содержания определенного уровня алкалоидов в семенах и зеленой массе. Первые сорта научной селекции были созданы в 1930-х гг., после выявления низкоалкалоидных мутантов. Производство этой культуры сдерживается нестабильной урожайностью и подверженностью болезням. Очевидно, что селекционеры имеют дело лишь с небольшой частью генофонда вида и ограниченными генетическими ресурсами, используя для получения новых сортов преимущественно низкоалкалоидные (сладкие) генотипы. Генетический потенциал вида можно задействовать эффективнее. При этом сидеральные сорта рационально создавать высокоалкалоидными (горькими), а продовольственные и кормовые за счет элиминации алкалоидов не должны терять адаптивные свойства, в том числе устойчивость к патогенам. В этом отношении продуктивной идеей представляется выведение сладко-горьких сортов, сочетающих высокое содержание алкалоидов в вегетативной массе и низкое – в семенах, чего можно добиться путем регулирования синтеза/транспорта алкалоидов в растении. В обзоре рассмотрены современное состояние использования вида в качестве сидерального, кормового, пищевого растения. Приведены сведения о количестве и качественном составе алкалоидов люпина узколистного, их прикладном значении, в частности фунгицидной, антибактериальной, инсектицидной функциях, применении отдельных алкалоидов люпина в качестве действующих начал лекарственных средств. Наряду с селекционным улучшением культуры обсуждаются возможные технологии переработки высокоалкалоидного сырья с сопутствующим извлечением ценных ингредиентов для фармацевтики. Кратко представлены сведения о геномных ресурсах вида и перспективах их использования в маркер-опосредованной селекции и при редактировании генома.


Ключевые слова: люпин узколистный; алкалоиды; доместикиция; селекция; кормовые; продовольственные; сидеральные сорта; фармакология; генетические и геномные ресурсы.

Для цитирования: Вишнякова М.А., Кушнарева А.В., Шеленга Т.В., Егорова Г.П. Алкалоиды люпина узколистного как фактор, определяющий альтернативные пути использования и селекции культуры. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):625-635. DOI 10.18699/VJ20.656

Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding

M.A. Vishnyakova , A.V. Kushnareva, T.V. Shelenga, G.P. Egorova

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

 e-mail: m.vishnyakova.vir@gmail.com

Abstract. Narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.), a valuable leguminous crop adapted to a wide range of climatic conditions, has a very short history of domestication. For many centuries it was used mainly as a green manure, since the success and prospects of the multi-purpose use of the species depend on its breeding improvement, in particular, on a particular concentration of alkaloids in seeds and green mass. The first varieties of scientific breeding were created only in the 1930s after the appearance of low-alkaloid mutants. Despite wide prospects for use in various areas of the national economy, unstable productivity and susceptibility to diseases hinder the production of this crop. Obviously, breeders deal only with a small part of the gene pool of the species and limited genetic resources, using mainly low-alkaloid (sweet) genotypes to create new varieties. The genetic potential of the species can be used more efficiently. At the same time, it is rational to create highly alkaloid (bitter) varieties for green manure, while food and feed varieties should not lose their adaptive potential, in particular, resistance to pathogens, due to the elimination of alkaloids. In this regard, it seems to be a productive idea to create bitter-sweet varieties combining a high content of alkaloids in the vegetative organs and low in seeds, which can be achieved by regulating the synthesis/transport of alkaloids in the plant. The paper discusses the current state of use of the species as a green manure, fodder, food plant. Information is given on the quantity and qualitative composition of narrow-leaved lupine alkaloids, their applied value, in particular, fungicidal, antibacterial, insecticidal, the use of lupine alkaloids as active principles of drugs. Along with promis-

ing breeding considerations, the possibility of using technologies for processing raw high-alkaloid materials with the accompanying extraction of valuable ingredients for pharmaceuticals is discussed. Information is briefly presented about the genomic resources of the species and the prospects for their use in marker-assistant selection and genome editing.

Key words: narrow-leaved lupine; alkaloids, domestication; breeding; feed; food; green manure; varieties; pharmacology; genetic and genomic resources.

For citation: Vishnyakova M.A., Kushnareva A.V., Shelenga T.V., Egorova G.P. Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):625-635. DOI 10.18699/VJ20.656

Введение

Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.), называемый также синим люпином, – один из трех культивируемых в Российской Федерации видов рода *Lupinus*. Наряду с люпином белым (*L. albus* L.) и люпином желтым (*L. luteus* L.), это ценная зернобобовая культура, в семенах которой содержится 30–40 % белка, до 40 % углеводов, 6 % масла, множество минеральных веществ, витаминов и других ценных ингредиентов, что ставит этот вид в ряд важнейших сельскохозяйственных культур.

Сегодня *L. angustifolius* значительно опережает другие возделываемые виды люпина по занимаемым площадям в мире. Он выращивается в Северной Европе, СНГ, США, Новой Зеландии. Мировой лидер производства и экспорта культуры – Австралия, где посевами люпина узколистного занято 0.6–0.7 млн га, а в его изучение и селекцию делаются большие капиталовложения. В РФ в 2018 г. производственные площади под *L. angustifolius* составили 35 тыс. га, что немного по масштабам страны. Тем не менее РФ входит в первую десятку стран, производящих эту культуру (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>).

Lupinus angustifolius – самый скороспелый и наиболее пластичный из производимых в нашей стране видов и единственный адаптированный к высоким северным широтам, до 60° с.ш. Растет на кислых песчаных почвах с дефицитом азота и фосфора и является мощным азотонакопителем. Вегетационный период в зависимости от сорта и климатических условий длится 70–120 дней, а для семеноводства достаточно суммы активных температур 1900 °С и 200–250 мм осадков за период от всходов до созревания. Выдерживает понижение температуры воздуха до –9 °С (Купцов, Такунов, 2006).

Возможные направления применения культуры еще не реализованы в полной мере. Исторически это сидеральная и кормовая культура. В наши дни стало возможно пищевое, фармакологическое, фиторемедиационное использование люпина, а также в качестве корма в аквакультуре. Обсуждаются его перспективы как биоэнергетического растения для производства биоэтанола (Kuznetsova et al., 2015) и источника растительного волокна (Kozlowski, Manys, 1997).

Интерес к культуре обусловлен наличием в семенах и зеленой массе растения вторичных метаболитов, главные из которых – хинолизидиновые алкалоиды, придающие горечь и обладающие токсичными свойствами как для человека, так и для животных. Полиморфизм генофонда вида по содержанию этих веществ в растении позволяет создавать сорта определенного назначения. Высокоалкалоидные генотипы перспективны в качестве сидеральных

растений и продуцентов алкалоидов для применения в фармакологии и медицине. Предназначение низкоалкалоидных генотипов – кормовое и продовольственное.

В настоящем обзоре анализируются различные направления использования генетических ресурсов люпина узколистного в зависимости от содержания в генотипах алкалоидов, характеристика алкалоидов люпина и их прикладное значение, обсуждаются актуальность создания сортов целевого назначения, генетические и геномные ресурсы для селекции, возможные технологии расширения использования хозяйственного потенциала вида.

История доместикиции и селекции

Центр происхождения люпина узколистного – Средиземноморье. В диком состоянии *L. angustifolius* встречается гораздо чаще, чем другие виды люпина Старого Света, и до сих пор распространен по всему Средиземноморью, а также натурализовался в Южной Африке и Юго-Западной Австралии (Gladstones et al., 1998). Из Средиземноморья растение распространилось в страны Центральной Европы, получив особое признание в Германии и Польше. В России люпин узколистный стал известен только в начале XX в.

В качестве зеленого удобрения (сидерата) и корма люпин использовали на протяжении тысячелетий. При скармливании животным семена люпина вымачивали в воде с неоднократной ее сменой для извлечения алкалоидов.

Революция в селекции люпина отмечена в 1926–1928 гг., когда немецкий исследователь Р. Зенгбуш выявил естественные низкоалкалоидные мутанты. Это позволило снизить содержание алкалоидов в семенах *L. albus*, *L. luteus* и *L. angustifolius* с традиционных 1–3 до 0.02 % и менее (Sengbusch, 1931). С этого времени началась селекция низкоалкалоидных (сладких) сортов кормового направления. Первые такие сорта появились в Германии, затем в Швеции, Дании и Польше. В СССР естественные малоалкалоидные мутанты были созданы в результате работы ученых ВИР и селекционеров Новозыбковской и Минской опытных станций (Анохина и др., 2012). В Австралии, куда люпины были интродуцированы в 1960-х гг. для улучшения севооборотов и освоения песчаных почв, первый сладкий сорт, адаптированный к местным условиям, появился уже в 1967 г., а массовое производство зернового люпина началось в 1973–1974 гг. (Gladstones, 1982).

Как у большинства культурных растений, генетическое разнообразие доместичированных форм люпина узколистного меньше, чем у дикорастущих популяций и местных сортов, и селекция имеет дело лишь с неболь-

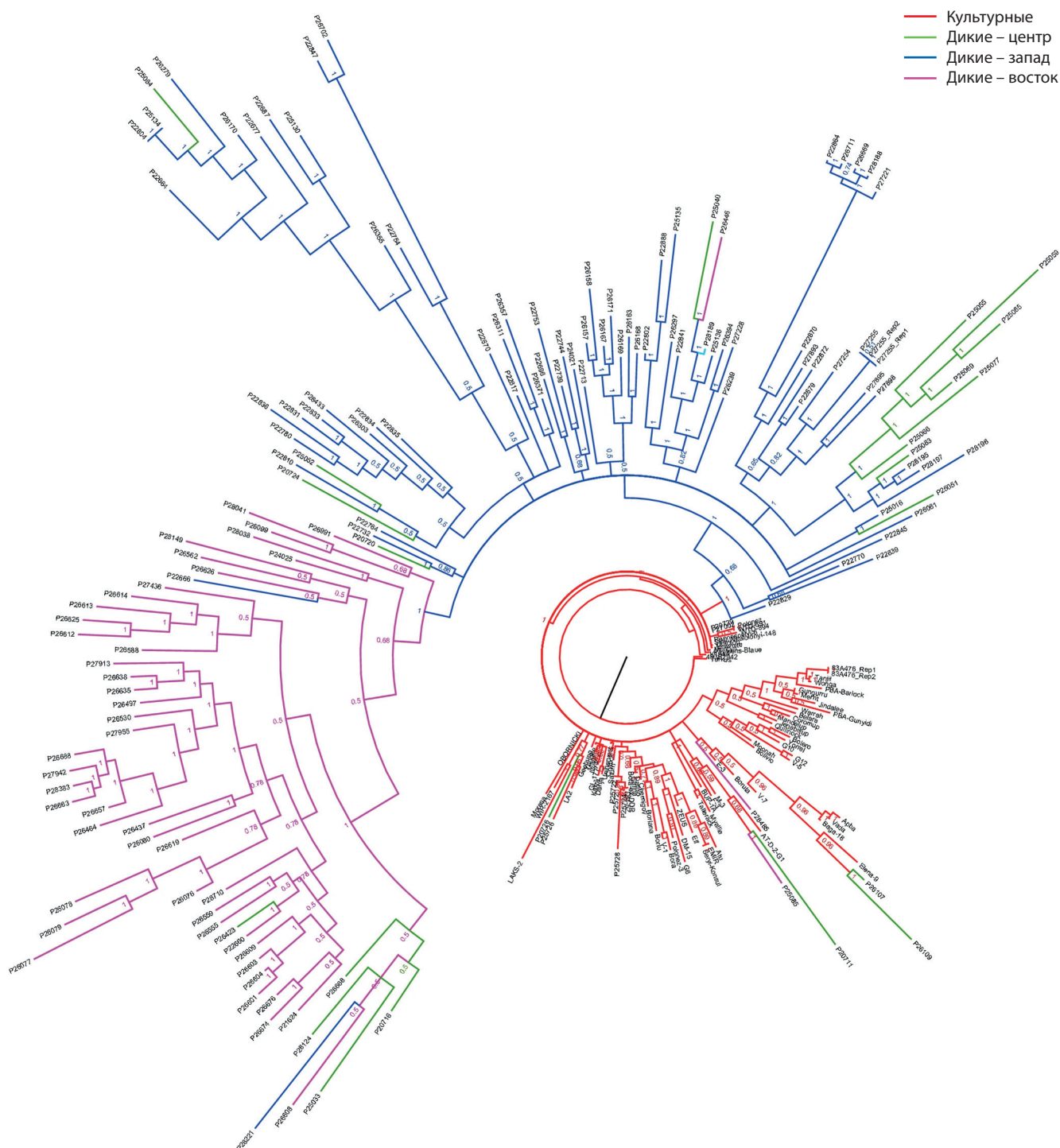


Рис. 1. Филогенетическое дерево диких и культурных образцов узколистного люпина, построенное на 11690 SNP с использованием MrBayes v3.2.2, по (Mousavi-Derazmahalleh et al., 2018).

Дикие образцы из центрального Средиземноморья (21 образец) обозначены зеленым цветом, из западного (77 образцов) – синим, восточного (49 образцов) – розовым. Культурные формы (87 образцов) выделены красным.

шой частью этого разнообразия (Berger et al., 2012a, b). Полногеномное секвенирование 146 диких и 87 культивируемых образцов из разных генбанков мира выявило, что разнообразие генома у современных сортов в три раза меньше, чем у диких популяций (Mousavi-Derazmahalleh et al., 2018) (рис. 1). Следует отметить, что 90 лет, прошедшие со времени создания первых низкоалкалоидных

сортов, – очень небольшой срок для сельскохозяйственной культуры и процесс внедрения данного вида в культуру нельзя считать завершенным.

В РФ селекцией узколистного люпина занимаются ВНИИ люпина, НИИ сельского хозяйства ЦРНЗ «Немчиновка», Ленинградский НИИСХ «Белогорка», МСХА им. К.А. Тимирязева и др. В настоящее время в Государ-

ственном реестре селекционных достижений РФ 27 сортов (<http://reestr.gossortrf.ru/reestr.html>).

Сорта ранних лет селекции, как правило, высокоалкалоидные, сорта же более поздней селекции за счет отбора малоалкалоидных генотипов преимущественно низкоалкалоидные (Анохина и др., 2012). По стандартам, принятым в некоторых европейских странах и в Австралии, содержание алкалоидов в семенах, предназначенных для пищевого и кормового назначения (сладких), не должно превышать 0.02 % их сухой массы (Frick et al., 2017). Для сортов кормового люпина в РФ установлен допустимый уровень от 0.1 до 0.3 % алкалоидов от сухого веса семян (ГОСТ Р 54632-2011, 2013), а для продовольственного люпина – 0.04 %, согласно существующим техническим условиям, разработанным во ВНИИ люпина (ТУ-9716-004-0068502-2008).

Люпин как сидеральная культура

Формируя урожай зеленой массы 45–60 т/га, люпин способен аккумулировать в биомассе 100–300 кг/га экологически безопасного биологического азота, что сравнимо с навозом. При этом создаются условия сохранения или повышения обеспеченности почвы органическим веществом, улучшаются ее физико-химические свойства и фитосанитарное состояние последующих посевов (Купцов, Такунов, 2006).

Благодаря глубоко проникающим корням и высокой растворяющей способности корневых выделений, люпин усваивает фосфор, калий, кальций, магний и другие элементы, чем обеспечивает интенсификацию их обращения в пахотном и подпахотном горизонтах. Помимо азота, в среднем один гектар люпина оставляет последующей культуре 30 кг фосфора и 50 кг калия (Яговенко и др., 2003).

Потребность в люпине узколистом как сидеральной культуре возрастает. Урожайность озимой ржи по сидеральному люпиновому пару без удобрений на серой лесной почве повышается на 5–10 ц/га (Gresta et al., 2017). Кроме того, алкалоиды, содержащиеся в запахиваемой зеленой массе, оказывают обеззараживающее воздействие на почву, в результате чего уменьшается поражение болезнями и вредителями последующих культур: зерновых – корневыми гнилями, картофеля – паршой, ризоктонией и картофельной нематодой (Евстратова и др., 2012). Это представляет несомненный интерес для защиты растений от возбудителей грибных болезней и указывает на необходимость дальнейших исследований механизма действия алкалоидов (Анохина и др., 2008; Romeo et al., 2018). Таким образом, высокое содержание алкалоидов становится предпочтительным качеством для сидеральных сортов, тем самым упрощая селекционные схемы.

Главные требования, предъявляемые сегодня к сортам люпина сидерального типа, – высокая урожайность сухого вещества, быстрый рост, высокая азотфиксирующая активность. Последние сорта российской селекции – Олигарх, Меценат, Аккорд (ЛНИИСХ «Белогорка») – содержат 1.5 % алкалоидов в семенах и 0.7 % в сухом веществе зеленой массы, обладают высокой урожайностью зеленой массы – 31–37 т/га, отличаются быстрым начальным ростом, скороспелостью и хорошей облиственностью,

готовы к запашке во второй половине июля, т. е. через 50–60 дней после всходов (Лысенко, 2019).

Кормовые достоинства люпина узколистного

Люпиновый корм считают хорошей альтернативой соевому: коэффициенты переваримости и энергетической ценности белков люпина не уступают сое и выше, чем у гороха, а урожайность на европейской территории РФ в 1.5–2 раза выше сои. Многие страны Европы не производят сою и вынуждены закупать ее преимущественно в странах Южной Америки, тогда как производственные площади узколистного люпина в европейских странах имеют перспективы к расширению. По оценкам специалистов, себестоимость выращивания зерна люпина в 2 раза ниже, чем зерна сои. К тому же узколистный люпин формирует высокие урожаи с более низкой, чем у сои, энергетической себестоимостью – 840.7–846.6 МДж/ц (Справочник..., 2014).

Ценность люпина как кормовой культуры определяется еще и тем, что не только зерно, но и зеленая масса, в сухом веществе которой находится 18–23 % сырого протеина и до 14 % сахара, поедается всеми видами сельскохозяйственных животных. Люпин употребляют свежескошенным, в виде комбикормов, силоса, сенажа, зерносенажа, дерты (Купцов, Такунов, 2006). Зеленая масса относится к высокопитательным сочным кормам, обладает хорошей переваримостью и поедаемостью. В соломе содержится до 7 % белка, что свидетельствует о более высокой ее кормовой ценности по сравнению с соломой хлебных злаков. Ее можно добавлять при силосовании зеленой массы других культур. Отаву люпина можно использовать для выпаса, особенно свиней и овец. Она гораздо питательней, чем стерня зерновых культур, ее даже сравнивают с пастбищем из бобовых трав. Выпас овец и телят на убранных полях зерновых и кормовых сортов люпина широко распространен в Австралии (Gladstones, 1970). При этом ценность представляет не только стерня, но и оставшиеся в поле семена, потеря которых при уборке достигает 150–400 кг/га (Truter et al., 2015).

Зерно люпина отличается высоким содержанием токоферола (3.9–16.2 мг %) и каротиноидов (10–21 мг %), из которых 90 % составляет каротин. Последнее особенно важно для аквакультуры, так как многие виды рыб не могут существовать без каротиноидов (Король, Лахмоткина, 2016а).

Использование люпина узколистного для пищевых целей

При обсуждении в качестве основных источников растительного белка для Западной Европы восьми сельскохозяйственных культур преимущество перед картофелем, тритикале, люцерной и др. получили люпин и горох (Linemann, Dijkstra, 2002; Dijkstra et al., 2003). При этом учитывались их агрономические достоинства, перспективы быстрого улучшения, выход и качество белка, технологические аспекты, функциональные и питательные свойства.

Начиная с конца XX в. ингредиенты семян люпина широко используются в пищевой промышленности ряда стран Европы, Канады, США, Чили, Австралии и незначительно – в России и Белоруссии. Ежегодно в Европе

потребляется около 500 тыс. т продуктов, содержащих люпин, включая люпиновую муку, люпиновые отруби, люпин-тофу и др., которые вводятся в хлеб, печенье, макаронные изделия, соусы, заменители молока, заменители сои в колбасах, пастах и т. д. В странах Южной Европы из семян горьких сортов традиционно производят популярную закуску lupine, напоминающую поп-корн, хлопья (Yañez, 1990).

Продукты из люпина рассматривают как функциональные. В них мало жира, крахмала. Они имеют низкий гликемический индекс, что учитывают в стратегии питания для борьбы с ожирением, диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Отсутствует глютен, что важно для больных целиакией и представляет собой ценный резерв для расширения спектра продовольственных товаров, ориентированных на эту категорию населения (Красильников и др., 2010; Панкина, Борисова, 2015). Белки люпина обладают эмульгирующей и пенообразующей способностью, позволяющей заменять ими масло и яйца в кулинарии (Kohajdová et al., 2011). Семена богаты ферритином – железосодержащим белком (Lucas et al., 2015).

Функциональную ценность зерну люпина в питании человека придают и пищевые волокна, которых в нем содержится до 41.5 % (Лахмоткина, 2011; Lucas et al., 2015). Для продуктов питания и нутрицевтиков представляет интерес люпиновое масло, характеризующееся сбалансированным составом жирных кислот и оптимальным соотношением 3- и 6-омега кислот – от 1:1.7 до 1:10.8 (Sedláková et al., 2016).

Фенольные компоненты и флавоноиды люпина узколистного обладают антиоксидантной активностью (Martínez-Villaluenga et al., 2009), уменьшают риск сердечно-сосудистых заболеваний благодаря защитному воздействию на кровеносные сосуды (Oomah et al., 2006), сдерживают развитие некоторых видов рака, в частности прямой кишки (Lima et al., 2016). В отличие от сои, люпин содержит невысокое количество фитоэстрогенов, а также меньше, чем другие бобовые, количество антипитательных веществ, таких как фитиновая кислота, олигосахариды, ингибиторы трипсина, лектины, танины и сапонины (Martínez-Villaluenga et al., 2009).

В семенах люпина присутствуют лютеин и зеаксантин – вещества, известные своей способностью сдерживать дегенерацию сетчатки глаза (Fryirs et al., 2008; Wang et al., 2008).

Больше всего в пищевой промышленности используется мука люпина. Она богата лизином, но бедна серосодержащими аминокислотами метионином и цистеином, поэтому может быть хорошим дополнением к пшеничной муке, в которой мало лизина (Dervas et al., 1999). Кроме повышения функциональности продуктов, добавление люпиновой муки в количестве 10 % в хлебобулочные и макаронные изделия, выпечку улучшает их текстуру, запах, цвет и продлевает срок годности (Pollard et al., 2002).

В РФ предложены технологии изготовления из зерна люпина паст, фаршей (Панкина, Борисова, 2015). Изучают свойства и влияние пищевых волокон из оболочки люпина при употреблении в качестве функциональных ингредиентов в мясных изделиях, в частности в рубленых полуфабрикатах из мяса птицы (Лахмоткина, 2011), и др.

Применение люпина в продовольственных целях растет во всем мире. В Австралии его называют суперфудом XXI в. Ожидается, что в ближайшем будущем, в связи с увеличением числа хронических сердечно-сосудистых и нервных заболеваний, диабета 2-го типа, вырастут основные международные рынки нутрицевтиков (в Европейском союзе, США, Японии). Огромный потенциальный рыночный спрос на продукты из люпина существует также в среде вегетарианцев, веганов и людей с непереносимостью глютена, сои, молока и яиц, а также в растущем секторе людей, исповедующих правильное питание (Lucas et al., 2015).

Алкалоиды люпина узколистного

Состав, изменчивость, токсичность

Алкалоиды – продукты вторичного метаболизма, которые, в отличие от первичных метаболитов, имеют функциональное значение не на уровне клетки, а на уровне целого растения. Чаще всего эти вещества выполняют «экологически» функции, т. е. защищают растение от различных вредителей и патогенов, обеспечивают взаимодействие растений между собой и с другими организмами в экосистеме и т. п. (Борисова и др., 2020).

Разные виды люпина имеют свой уникальный алкалоидный профиль. Обычно он состоит из четырех-пяти основных и нескольких минорных алкалоидов. Качественный состав алкалоидов используют для уточнения таксономии видов (Frick et al., 2017).

Полиморфизм генофонда люпина узколистного по содержанию алкалоидов в семенах (0.0005–2.8752 %) отражен в работе польских исследователей, изучивших 329 коллекционных образцов (Kamel et al., 2016). Общее для всех видов – высокое содержание алкалоидов в семенах (до 4 %) и меньшее – в вегетативной массе (до 1.5 %). В цветках фиксируется до 2.5 % алкалоидов, в корнях – минимальное количество (Lee et al., 2007).

Превалирующие алкалоиды в семенах люпина узколистного – люпанин (65–75 % от общего количества алкалоидов), ангустифолин (10–15 %) и 13-гидроксилюпанин (10–15 %). В минорном количестве встречаются спартеин и люпинин (Blaschek et al., 2016). Эти значения варьируют в зависимости от генотипа и места его произрастания. Известно, что концентрация алкалоидов в органах растения и их соотношение могут меняться в зависимости от условий выращивания (Cowling, Tarr, 2004). Даже в низкоалкалоидных сортах их содержание в разных условиях может изменяться в довольно широких пределах, превышающих ПДК (Романчук, Анохина, 2018). Установлено, что у люпинов, растущих в высоких широтах, содержание алкалоидов меньше, чем в южных районах (Gresta et al., 2017).

Накопление алкалоидов происходит не одновременно в разных органах растения. В фазу ветвления, когда фотосинтез особенно активен, самое высокое содержание алкалоидов определяется в листьях. В фазу цветения происходит интенсивный отток алкалоидов из вегетативных органов растения в генеративные, где их содержание достигает максимума к началу созревания бобов. Для каждой стадии развития растения характерен свой качественный

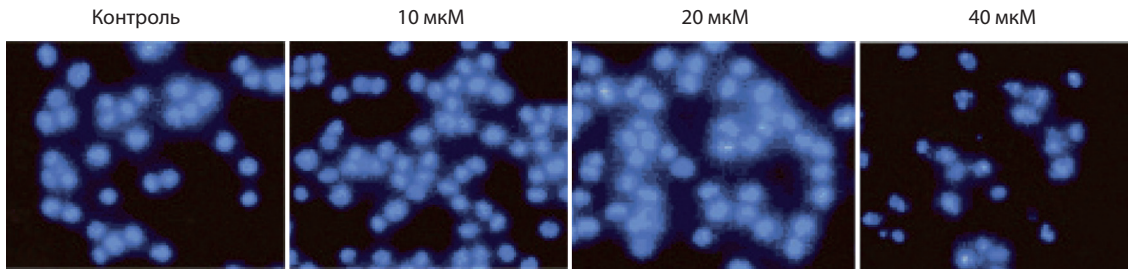


Рис. 2. Интенсивность индуцированного ангустифолином апоптоза в культурах клеток злокачественной опухоли толстой кишки человека усиливается при увеличении концентрации ангустифолина в среде, по (Ding et al., 2019).

Флуоресцентная микроскопия с красителем DAPI.

состав вторичных метаболитов, в том числе алкалоидов. В начале ветвления доминирует гидроксилупанин, во время цветения и образования бобов – люпанин. К периоду созревания в семенах алкалоидов в 5–10 раз больше, чем в зеленой массе (Акритиду и др., 2015). По токсичности наиболее опасны спартеин и люпанин, далее по убывающей – люпинин, гидроксилупанин, ангустифолин (Allen, 1998).

Интересно, что при механическом повреждении растения количество алкалоидов в нем возрастает в 4 раза. Рана в данном случае мимикрирует прокус насекомого, что может свидетельствовать о защитной функции алкалоидов. При этом люпанин оказывает самое сильное токсическое воздействие на сосущих насекомых (Wink, 1983, 1992).

Эффективным подходом к оценке активности биосинтеза алкалоидов в генофонде вида и влияния на этот процесс разнообразных абиотических и биотических факторов среды может стать метаболомное профилирование. Изучение метаболомных профилей дикорастущих форм люпина позволит установить или уточнить роль отдельных алкалоидов в адаптации вида к изменяющимся условиям окружающей среды (Романчук, Анохина, 2018).

Прикладное значение алкалоидов

С давних времен алкалоиды нашли применение в медицине, фармакологии, ветеринарии и других областях. Прежде всего они входят в качестве действующего начала в состав лекарственных средств, используемых в комплексной терапии многих опасных заболеваний, включая рак (Круглов и др., 2015; Ding et al., 2019). Предупреждают возникновение различных дегенеративных заболеваний, связывая свободные радикалы и ионы металлов, активирующих ферменты окислительных реакций. Ингибируют рост и развитие грибов, простейших, бактерий и т. д. (Ding et al., 2019).

Наиболее широкое применение получил спартеин. Он снижает уровень глюкозы в организме и инициирует секрецию инсулина (Sgambato et al., 1986), проявляет легкое обезболивающее действие, является противосудорожным и противозепилептическим средством (Villalpando-Vargas, Medina-Ceja, 2016). Наряду с люпанином и гидроксилупанином он используется в составе противоишемических препаратов. При этом антиаритмический эффект уменьшается в ряду спартеин–люпанин–гидроксилупанин (Blaschek et al., 2016). Среди препаратов класса IA, при-

меняемых при тахикардиях, представлен комбинированный препарат «пульсонорма», в составе которого присутствуют аймалин, спартеин, антазолин и фенобарбитал (Ивашев и др., 2013).

Люпанин – очень активный нейротрансмиттер для nAChR (никотиновых ацетилхолиновых рецепторов), которые имеют решающее значение для передачи нейронного сигнала. Выявлена его способность увеличивать секрецию инсулина (Wiedemann et al., 2015). Он может быть использован в качестве исходного материала для синтеза других алкалоидов, искусственное получение которых очень сложно (Wink, 1987).

Ангустифолин на культурах клеток злокачественной опухоли толстой кишки человека (линия COLO-205) индуцировал автофагию опухолевых клеток, процессы апоптоза и остановку клеточного цикла на стадии G2/M, что позволяет рассматривать его как противоопухолевый препарат (Ding et al., 2019) (рис. 2).

Люпинин обладает умеренной антигликативной активностью, при этом не цитотоксичен (Abbas et al., 2017). Ему присуща также сильная инсектицидная активность (Campbell et al., 1933).

Постоянно подтверждаются аллелопатические свойства алкалоидов люпина (Wink, 1993), в частности анти-микробная активность в культурах золотистого стафилококка, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* Mig., *Bacillus subtilis* Cohn., *Klebsiella pneumoniae* Trevis., в концентрациях на три-четыре порядка ниже, чем антибиотиков (Erdemoglu et al., 2007).

In vivo на козах показана умеренная, но достоверная активность экстракта семян люпина против нематод *Haemonchus contortus* и *Teladorsagia circumcincta* (Dubois et al., 2019).

Неоднократно доказано антифунгицидное действие алкалоидов. Отмечены повышенная устойчивость высокоалкалоидных сортов люпина по сравнению с низкоалкалоидными к фузариозу, увеличение содержания алкалоидов в клетках растения в ответ на заражение его возбудителями. Подтверждена возможность применения очищенных люпиновых алкалоидов для обработки семян зернобобовых культур, пшеницы и льна перед посевом для повышения их устойчивости к антракнозу, фузариозу и другим грибковым заболеваниям. Преимущество алкалоидов перед синтетическими фунгицидами состоит в их биоразлагаемости и меньшей токсичности (Анохина и др., 2008).

Новые пути селекции или старые способы переработки?

У люпина узколистного известно пять генов, снижающих содержание алкалоидов в семенах: *iuc* (*iucundus*), *es* (*esculentus*) (Hackbarth, 1957), *dep* (*depressus*) (Hackbarth, Troll, 1956), *a1*, *a2*, *a3* (*angustifolius*) (Mikolajczyk, 1966), *tant* (*tantalus*) (Zachow, 1967). Ген *iuc* определяет снижение концентрации алкалоидов приблизительно до 0.06 % их сухого веса, ген *dep* детерминирует очень низкое их содержание (около 0.01 %), в то время как действие гена *es* определяет промежуточное значение их концентрации (Hackbarth, Troll, 1956). Каждый этап синтеза алкалоидов находится под контролем определенных аллелей, способных к независимому мутированию и рекомбинации. Возможны неаллельные мутации, имеющие сходный фенотипический эффект – низкое содержание или отсутствие алкалоидов (Анохина, 1975). Открытие комплементарного взаимодействия генов безалкалоидности позволило получить первые формы с полным отсутствием алкалоидов путем объединения в генотипе генов двух неаллельных рецессивных мутантов (Sengbusch, 1942). Таким образом, отсутствие или низкое содержание алкалоидов – это сложный количественный признак полигенной природы со свободной комплементацией его неаллельных комплементарных генов (Анохина, 1975), что очень затрудняет селекцию и семеноводство культуры.

По мере создания сладких сортов было отмечено, что они обладают значительно меньшей устойчивостью к болезням и вредителям по сравнению с горькими. У них повышается подверженность атакам насекомых и, соответственно, вирусным болезням, переносимым, в частности, тлями (Berlandier, 1996; Adhikari et al., 2012). Конец XX в. был ознаменован эпифитотиями фузариоза и антракноза люпина узколистного во всех производящих его странах мира. Возникли идеи по созданию сладкогорьких сортов, сочетающих в себе горечь вегетативной массы в качестве средства защиты от вредителей и низкое содержание алкалоидов в семенах для употребления их в кормовых и пищевых целях (Wink, 1990; Philippi et al., 2015). Для осуществления этой идеи необходимо знание всего многоступенчатого пути биосинтеза алкалоидов, который начинается в хлоропластах молодых листьев люпина (Wink, Hartmann, 1982; Bunsupa et al., 2012), а затем по флоэме они транспортируются в генеративные органы (Lee et al., 2007). Недавние исследования экспрессии генов биосинтеза алкалоидов показали полное или практически полное отсутствие его в семенах, что подтверждает их транспорт из других тканей (Otterbach et al., 2019).

Биосинтез хинолизидиновых алкалоидов изучен гораздо меньше, чем некоторых экономически важных алкалоидов других растений, представляющих модельные виды для понимания этого процесса (представителей рода *Nicotiana*, вида *Papaver somniferum* и др.). Поэтому предпринимаются попытки понять пути синтеза и транспорта алкалоидов люпина с привлечением знаний о синтезе других алкалоидов и поисков генов-гомологов, см. (Bunsupa et al., 2012; Kamel et al., 2016; Frick et al., 2017; Романчук, Анохина, 2018).

Наряду с постановкой этих задач селекции, которые в перспективе могут быть решены посредством современ-

ных технологий обратной селекции или редактирования геномов, исследователи пытаются модернизировать многовековой опыт удаления горечи из зерен и зеленой массы люпина. Разрабатывают технологии, позволяющие экстрагировать алкалоиды из больших объемов растительного сырья горьких сортов и тем самым делать его пригодным для корма. К примеру, в 2013 г. в РФ была разработана и запатентована рентабельная биотехнология глубокой переработки зерна люпина в среде молочной сыворотки. Линия может встраиваться в технологический процесс любого комбикормового завода (Король, Лахмоткина, 2016). Термальной обработкой семян щелочными растворами возможно добиться снижения концентрации алкалоидов в семенах до 0.003 % (Jiménez-Martínez et al., 2001). В Португалии на производствах по экстрагированию алкалоидов из больших объемов люпина, потребляющих значительное количество воды, испытали технологию детоксикации сливаемой жидкости путем ее нанофильтрации и связывания 99 % имеющегося в ней люпинина для использования его в качестве сырья в фармакологической промышленности (Barbeitos, 2016).

Таким образом, на современном этапе существуют два пути получения безалкалоидного сырья для продовольственного и кормового использования: длительное и непростое создание низкоалкалоидных сортов методами традиционной селекции и технологические линии удаления/экстракции алкалоидов. Прорыв в этом направлении связан с геномными технологиями селекции, определенный успех которых для люпина узколистного очевиден.

Генетические и геномные ресурсы люпина узколистного

Для интенсификации селекции нужен богатый исходный материал. В нескольких генбанках мира собрано мировое разнообразие вида. Самые большие коллекции в Австралии, Польше, Португалии, РФ. Австралийская коллекция включает преимущественно дикие формы, рекомбинантные инбредные линии и популяции мутантов, а также межвидовые гибриды. Эти ресурсы используют для изучения генетического и молекулярного контроля ключевых признаков; процесс может быть ускорен за счет текущих исследований по секвенированию генома *L. angustifolius*. Главная цель австралийских исследователей – расширение генетической основы вида, в том числе с привлечением диких форм. Предполагается интрогрессия желаемых признаков на основе маркеров (Berger et al., 2013). Маркеропосредованная селекция уже стала интегральной частью селекционных программ в Австралии, ускорив создание новых сортов (Rychel et al., 2015).

Разработаны генетические карты узколистного люпина (Yang et al., 2013; Kamphuis et al., 2015) и большие библиотеки геномных вставок (Gao et al., 2011). Выявлены и картированы гены, отвечающие за проявление хозяйственно важных признаков, включая содержание алкалоидов (Boersma et al., 2005; Bunsupa et al., 2011).

Из пяти известных генов, определяющих общее содержание алкалоидов у люпина узколистного, в селекционных программах используется только один рецессивный ген, *iuc*. Его молекулярные функции еще не определены. Найдены маркеры к локусу *iuc*, а более плотные картогра-

фические ресурсы и аннотация генома еще больше сузили область гена-кандидата *iucundus* (Li et al., 2011; Hane et al., 2016). Для быстрого развития маркеров для селекции применяют технологию NGS (next generation sequence) (Yang et al., 2015).

Пути синтеза алкалоидов частично известны, однако их генетическая основа остается до сих пор мало изученной. По результатам транскриптомного секвенирования (RNA-seq) и анализа дифференцированно экспрессирующихся генов в выборке, содержащей и горькие, и сладкие образцы люпина узколистного, найдено 13 генов, предположительно вовлеченных в синтез хинолизиновых алкалоидов (Kamel et al., 2016). Идентифицированные гены биосинтеза алкалоидов были картированы, но только один транскриптомный фактор RAP2-семейства факторов, регулирующих вторичный метаболизм, был тесно связан с геном *iuc* (Kroc et al., 2019). Исследование картирующих популяций методом массивного анализа концов кДНК (MACE) подтвердило идею о том, что ген *ETHYLENE RESPONSIVE TRANSCRIPTION RAC2-7* может контролировать малоалкалоидный фенотип у узколистного люпина (Plewiński et al., 2019).

Заклучение

Генофонд люпина узколистного необходимо сделать объектом более пристального изучения на фенотипическом и генотипическом уровнях, чтобы имеющееся в нем разнообразие стало более очевидным и доступным для селекции. Это позволит оптимизировать создание сортов с заданными свойствами. При этом сидеральные сорта рационально создавать высокоалкалоидными, а у продовольственных и кормовых за счет элиминации алкалоидов следует сохранять адаптивные свойства, в частности устойчивость к патогенам. В этом отношении продуктивной идеей представляется создание сладко-горьких сортов, сочетающих высокое содержание алкалоидов в вегетативной массе и низкое – в семенах. Ее реализация зависит от познания путей биосинтеза и транспорта алкалоидов в растении и возможности воздействия на них, что при наличии геномных ресурсов, имеющихся на сегодняшний день, представляется задачей недалекого будущего. Однако на современном этапе нецелесообразно отказываться и от рутинных технологий переработки растительного сырья методами экстракции алкалоидов с сопутствующим извлечением ценных ингредиентов для фармацевтики. Генетические ресурсы – фенотипирование – метаболомика – традиционная селекция; геномные ресурсы – маркер-опосредованная и геномная селекция/редактирование генома; рентабельные технологии экстракции алкалоидов из сырья горьких сортов – таковы, на наш взгляд, пути совершенствования хозяйственного потенциала и овладения им у этой ценной зернобобовой культуры в настоящее время и в ближайшем будущем.

Список литературы / References

Акритиду Х.П., Бойник В.В., Блажеевский Н.Е. Определение суммы алкалоидов в сухих экстрактах семян и корней люпина многолистного методом амперометрического титрования. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2015;2(40):4-8.

- [Akritidou Ch.P., Boynik V.V., Blazheyevskiy N.Ye. Determination of total alkaloids in dry extracts of seeds and roots of multileaved lupine by amperometric titration method. *Upravlenie, Ekonomika i Obespechenie Kachestva v Farmatsii = Management, Economics and Quality Assurance in Pharmacy*. 2015;2(40):4-8. (in Russian)]
- Анохина В.С. Изучение явления генетической комплементарности по признаку алкалоидности у сложных межсортовых гибридов кормового люпина. В: Исследования по теоретической и прикладной генетике. Минск, 1975;108-112.
- [Anokhina V.S. Study of the phenomenon of genetic complementation for the alkaloid content trait in compound intervarietal hybrids of forage lupine. In: *Research in Theoretical and Applied Genetics*. Minsk, 1975;108-112. (in Russian)]
- Анохина В.С., Дебелый Г.А., Конорев П.М. Люпин. Селекция. Генетика. Эволюция. Минск, 2012.
- [Anokhina V.S., Debely G.A., Konorev P.M. Lupine: Breeding. Genetics. Evolution. Minsk, 2012. (in Russian)]
- Анохина В.С., Каминская Л.Н., Цибульская И.Ю. Алкалоиды люпина: их фунгицидные эффекты. *Молекуляр. и прикл. генетика*. 2008;8:138-142.
- [Anokhina V., Kaminskaya L., Tsiubulskaya I. Lupine alkaloids: fungicidal effects. *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics*. 2008;8:138-142. (in Russian)]
- Борисова Г.Г., Ермошин А.А., Малева М.Г., Чукина Н.В. Биохимия растений: вторичный обмен. М.: Юрайт, 2020.
- [Borisova G.G., Ermoshin A.A., Maleva M.G., Chukina N.V. Plant Biochemistry: Secondary Metabolism. Moscow: Yurait Publ., 2020. (in Russian)]
- Евстратова Л.П., Николаева Е.В., Богословский С.А. Влияние биомассы люпина узколистного на урожайность картофеля в природных очагах *Globodera rostochiensis* Woll. *Учен. зап. Петрозаводского гос. ун-та. Сер.: Естество. и техн. науки*. 2012;8(2):30-33.
- [Evstratova L.P., Nikolaeva E.V., Bogoslovsky S.A. Influence of narrow-leaved blue lupin biomass on potato yield in natural habitat of *Globodera rostochiensis* Woll. *Uchenye Zapiski Petrozavodskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Scientific Notes of Petrozavodsk State University. Natural and Technical Sciences Series*. 2012;8(2):30-33. (in Russian)]
- Ивашев М.Н., Сергиенко А.В., Лысенко Т.А., Арльт А.В., Зацепина Е.Е., Куянцева А.М., Савенко И.А., Саркисян К.Х. Клиническая фармакология антиаритмических лекарственных средств в обучении студентов. *Международ. журн. эксперим. образования*. 2013;1:67-70.
- [Ivashov M.N., Sergienko A.V., Lysenko T.A., Arlt A.V., Zatssepina E.E., Kuyantseva A.M., Savenko I.A., Sarkisyan K.Kh. Clinical pharmacology of antiarrhythmic medicines in training of students. *Mezhdunarodnyi Zhurnal Eksperimentalnogo Obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*. 2013;1:67-70. (in Russian)]
- Король В.Ф., Лахмоткина Г.Н. Люпин как важный источник белка и компонент комбикорма. *Птицеводство*. 11 мая. 2016а. <https://www.agbz.ru/articles/lyupin-kak-vajnyiy-istochnik-belka-i-komponent-kombikorma> (дата обращения: 18.01.2020).
- [Korol V.F., Lakhmotkina G.N. Lupine as an important source of protein and compound feed component. *Aviculture*. May 11, 2016a. <https://www.agbz.ru/articles/lyupin-kak-vajnyiy-istochnik-belka-i-komponent-kombikorma> (Accessed January 18, 2020). (in Russian)]
- Король В.Ф., Лахмоткина Г.Н. Переработка зерна люпина: новые технологии. *Растениеводство*. 19 апреля. 2016б. <https://www.agbz.ru/articles/pererabotka-zerna-lyupina-novyie-tehnologi> (дата обращения: 12.02.2020).
- [Korol V.F., Lakhmotkina G.N. Lupine grain processing: new technologies. *Plant Industry*. April 19. 2016b. <https://www.agbz.ru/articles/pererabotka-zerna-lyupina-novyie-tehnologi> (Accessed February 12, 2020). (in Russian)]

- Красильников В.Н., Мехтиев В.С., Доморощенко М.Л., Демьяненко Т.Ф., Гаврилюк И.П., Кузнецова Л.И. Перспективы использования белков из семян люпина узколистного. *Пищевая промышленность*. 2010;2:40-43.
[Krasilnikov V.N., Mehtiev V.S., Domoroshchenkova M.L., Demyanenko T.F., Gavriulyuk I.P., Kuznetsova L.I. Prospects for the use of protein from seeds of narrow-leaved lupine. *Pishcheyaya Promyshlennost = Food Industry*. 2010;2:40-43. (in Russian)]
- Круглов Д.С., Ханина М.А., Макарова Д.Л., Величко В.В. Алкалоиды. Лекарствоведение алкалоидоносного сырья. *Международ. журн. эксперим. образования*. 2015;5(2):269.
[Kruglov D.S., Khanina M.A., Makarova D.L., Velichko V.V. Alkaloids: Pharmacognosy of alkaloid-bearing material. *Mezhdunarodnyi Zhurnal Eksperimentalnogo Obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*. 2015;5(2):269. (in Russian)]
- Купцов Н.С., Такунов И.П. Люпин (Генетика, селекция, гетерогенные посевы). Брянск, 2006.
[Kuptsov N.S., Takunov I.P. Lupine: Genetics, breeding, heterogeneous cultivation. Bryansk, 2006. (in Russian)]
- Лажмоткина Г.Н. Пищевые волокна люпина как ингредиент продуктов функционального питания. *Пищевая промышленность*. 2011;11:29-31.
[Lakhmotkina G.N. Lupine dietary fiber as a functional food ingredient. *Pishcheyaya Promyshlennost = Food Industry*. 2011;11:29-31. (in Russian)]
- Лысенко О.Г. Люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.) – сидеральная культура. *Научные труды по агрономии*. 2019;2(2):45-50.
[Lysenko O.G. Narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) – sideral culture. *Nauchnye Trudy po Agronomii = Scientific Works on Agronomy*. 2019;2(2):45-50. (in Russian)]
- Панкина И.А., Борисова Л.М. Разработка рецептур комбинированных кулинарных изделий на основе зерна люпина. В: Технология и продукты здорового питания: Материалы IX Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 20-летию специальности, Саратов, 1–12 дек. 2015 г. Саратов, 2015;326-329.
[Pankina I.A., Borisova L.M. Development of combined culinary products based on lupine grain. In: Healthy Food Technologies and Products: Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference dedicated to the 20th anniversary of the branch of science, Saratov, Dec. 1–12, 2015. Saratov, 2015;326-329. (in Russian)]
- Романчук И.Ю., Анохина В.С. Алкалоиды люпина: строение, биосинтез, генетика. *Молекуляр. и прикл. генетика*. 2018;25:108-123.
[Romanchuk I.Yu., Anokhina V.S. Lupine alkaloids: structure, biosynthesis, genetics. *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics*. 2018;25:108-123. (in Russian)]
- Справочник по кормопроизводству. 5-е изд., перераб. и дополненное. М.: Россельхозакадемия, 2014.
[Feed Production Handbook. 5th edition revised and supplemented. Moscow: Rosselkhozakademiya Publ., 2014. (in Russian)]
- Яговенко Л.Л., Такунов И.П., Яговенко Г.Л. Влияние люпина на свойства почвы при его запашке на сидерацию. *Агрохимия*. 2003;6:71-80.
[Yagovenko L.L., Takunov I.P., Yagovenko G.L. The effect of lupine plowed in as green manure on soil properties. *Agrokhimiya = Agrochemistry*. 2003;6:71-80. (in Russian)]
- Abbas G., Al-Harrasi A.S., Hussain H., Sattar S.A., Choudhary M.I. Identification of natural products and their derivatives as promising inhibitors of protein glycation with non-toxic nature against mouse fibroblast 3T3 cells. *Int. J. Phytomed*. 2017;8(4):533-539. DOI 10.5138/09750185.1924.
- Adhikari K.N., Edwards O.R., Wang S., Ridsdill-Smith T.J., Buirchell B. The role of alkaloids in conferring aphid resistance in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Crop Pasture Sci*. 2012;63:444-451. DOI 10.1071/CP12189.
- Allen J.G. Toxins and lupinosis. In: Gladstones J.S., Atkin C.A., Hamblin J. (Eds.). *Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*. CAB International, 1998;411-428.
- Barbeitos C.B.M. Towards the development of a process for lupin beans detoxification wastewater with lupanine recovery: Thesis to obtain the Master of science degree in Biological Engineering. Técnico Lisboa, 2016.
- Berger J.D., Buirchell B., Luckett D.J., Nelson M.N. Domestication bottlenecks limit genetic diversity and constrain adaptation in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Theor. Appl. Genet*. 2012a;124:637-652. DOI 10.1007/s00122-011-1736-z.
- Berger J.D., Buirchell B., Luckett D.J., Palta J.A., Ludwig C., Liu D. How has narrow-leaved lupin changed in its 1st 40 years as an industrial, broad-acre crop? A G×E-based characterization of yield-related traits in Australian cultivars. *Field Crops Res*. 2012b;126:152-164. DOI 10.1016/j.fcr.2011.10.014.
- Berger J.D., Clements J.C., Nelson M.N., Kamphuis L.G., Singh K.B., Buirchell B. The essential role of genetic resources in narrow-leaved lupin improvement. *Crop Pasture Sci*. 2013;64:361-373. DOI 10.1071/CP13092.
- Berlandier F.A. Alkaloid level in narrow-leaved lupin, *Lupinus angustifolius*, influences green peach aphid reproductive performance. *Entomol. Exp. Appl*. 1996;79:19-24. DOI 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00804.x.
- Blaschek W., Ebel S., Hilgenfeldt U., Holzgrabe U., Reichling J., Schulz V., Barthlott W., Höltje H.-D. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. 2016. Available at: <http://www.drugbase.de/de/datenbanken/hagers-enzyklopaedie.html> (Accessed March 23, 2020).
- Boersma G.J., Pallotta M., Li C., Buirchell B.J., Sivasithamparam K., Yang H. Construction of a genetic linkage map using MFLP and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Cell. Mol. Biol. Lett*. 2005;10:331-344.
- Bunsupa S., Okada T., Saito K., Yamazaki M. An acyltransferase-like gene obtained by differential gene expression profiles of quinolizidine alkaloid-producing and non-producing cultivars of *Lupinus angustifolius*. *Plant Biotechnol*. 2011;28:89-94. DOI 10.5511/plantbiotechnology.10.1109b.
- Bunsupa S., Yamazaki M., Saito K. Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Front. Plant Sci*. 2012;3:239. DOI 10.3389/fpls.2012.00239.
- Campbell F.L., Sullivan W.N., Smith C.R. The relative toxicity of nicotine, anabasine, methyl anabasine, and lupinine for culicine mosquito larvae. *J. Econ. Entomol*. 1933;26(2):500-509. DOI 10.1093/jee/26.2.500.
- Cowling W., Tarr A. Effect of genotype and environment on seed quality in sweet narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Aust. J. Agric. Res*. 2004;55:745-751. DOI 10.1071/AR03223.
- Dervas G., Doxastakis G., Hadjisavva-Zinoviadi S., Triantafyllakos N. Lupine flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chem*. 1999;66:67-73.
- Dijkstra D.S., Linnemann A.R., van Boekel T.A. Towards sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part II: Analysis of the technological aspects of the production chain. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2003;43(5):481-506. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.09.088.
- Ding Z., Chen Q., Xiong B., Cun Y., Wang H., Xu M. Angustifoline inhibits human colon cancer cell growth by inducing autophagy along with mitochondrial-mediated apoptosis, suppression of cell invasion and migration and stimulating G2/M cell cycle arrest. *J. BUON*. 2019;24(1):130-135.
- Dubois O., Allanic C., Charvet C.L., Guégnard F., Février H., Théry-Koné I., Cortet J., Koch C., Bouvier F., Fassier T., Marcon D., Magnin-Robert J.B., Peineau N., Courtot E., Huac C., Meynadier A., Enguehard-Gueffier C., Neveu C., Boudesocque-Delaye L., Sallé G. Lupin (*Lupinus* spp.) seeds exert antihelminthic activity as-

- sociated with their alkaloid content. *Sci. Rep.* 2019;9(1):9070. DOI 10.1038/s41598-019-45654-6.
- Erdemoglu N., Ozkan S., Tosun F. Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochem. Rev.* 2007;6(1):197-201.
- Frick K.M., Kamphuis L.G., Siddique K.H.M., Singh K.B., Foley R.C. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1-12. DOI 10.3389/fpls.2017.00087.
- Fryirs C., Eisenhauer B., Duckworth Ch. Luteins in lupins – an eye for health. In: Proc. 12th Int. Lupin Conf. Fremantle, 2008;488-490.
- Gao L.-L., Hane J.K., Kamphuis L.G., Foley R., Shi B.-J., Atkins C.A., Singh K.B. Development of genomic resources for the narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*): construction of a bacterial artificial chromosome (bac) library and bac-end sequencing. *BMC Genomics.* 2011;12:521. DOI 10.1186/1471-2164-12-521.
- Gladstones J.S. Lupins in Western Australia. The grazing value of green and mature lupins. *J. Agric. West. Austr.* 1970:103-106.
- Gladstones J.S. Breeding lupins in Western Australia. *J. Agric. West. Austr.* 1982;23:73.
- Gladstones J.S., Atkin C.A., Hamblin J. (Eds.). *Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization.* CAB International, 1998.
- Gresta F., Wink M., Prins U., Abberton M., Capraro J., Scarafoni A., Hill G. Lupins in European cropping systems. In: *Legumes in Cropping Systems.* CAB International, 2017;88-108. DOI 10.1079/9781780644981.0088.
- Hackbarth J. Die Gene der Lupinenarten III. Schmalblattige Lupinen (*Lupinus angustifolius* L.). *Z. Pflanzenzüchtung.* 1957;37:81-95.
- Hackbarth J., Troll H.J. Lupinen als Körnerleguminosen und Futterpflanzen. In: *Handbuch der Pflanzenzüchtung.* 1956;IV:1-51.
- Hane J.K., Ming Y., Kamphuis L.G., Nelson M.N., Garg G., Atkins C.A., Bayer P.E., Bravo A., Bringans S., Cannon S., Edwards D., Foley R., Gao L.L., Harrison M.J., Huang W., Hurgobin B., Li S., Liu C.W., McGrath A., Morahan G., Murray J., Weller J., Jian J., Singh K.B. A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant-microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnol. J.* 2016;15:318-330. DOI 10.1111/pbi.12615.
- Jiménez-Martínez C., Hernández-Sánchez H., Álvarez-Manilla G., Robledo-Quintos N., Martínez-Herrera J., Dávila-Ortiz G. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. *J. Sci. Food Agric.* 2001;81:421-428.
- Kamel K.A., Świącicki W., Kaczmarek Z., Barzyk P. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2016;63:711-719. DOI 10.1007/s10722-015-0278-7.
- Kamphuis L.G., Hane J.K., Nelson M.N., Gao L., Atkins C.A., Singh K.B. Transcriptome sequencing of different narrow-leaved lupin tissue types provides a comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. *Plant Biotechnol. J.* 2015;13:14-25. DOI 10.1111/pbi.12229.
- Kohajdorová Z., Karovičová J., Schmidt Š. Lupin composition and possible use in bakery – a review. *Czech J. Food Sci.* 2011;29(3):203-211.
- Kozłowski R., Manys S. Coexistence and competition of natural and man-made fibres. In: Proc. of the 78th World Conference of the Textile Institute. Thessaloniki, Greece, 1997;3-52.
- Kroc M., Koczyk G., Kamel K.A., Czepiel K., Fedorowicz-Strońska O., Krajewski P., Kosińska J., Podkowiński J., Wilczura P., Świącicki W. Transcriptome-derived investigation of biosynthesis of quinolizidine alkaloids in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) highlights candidate genes linked to *iucundus* locus. *Sci. Rep.* 2019;9:2231. DOI 10.1038/s41598-018-37701-5.
- Kuznetsova L., Zabodalova L., Domoroshchenkova M. Lupinwhey as a perspective substrate for bioethanol production. *Energy Procedia.* 2015;72:103-110. DOI 10.1016/j.egypro.2015.06.015.
- Lee M.J., Pate J.S., Harris D.J., Atkins C.A. Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *Lupinus angustifolius* L. *J. Exp. Bot.* 2007;58:935-946.
- Li X., Yang H., Buirchell B., Yan G. Development of a DNA marker tightly linked to low-alkaloid gene *iucundus* in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) for marker-assisted selection. *Crop Past. Sci.* 2011;62:218-224.
- Lima A.I., Mota J., Monteiro S.A., Ferreira R.M. Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration. *Food Chem.* 2016;197(Pt.A):30-38. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.10.063.
- Linnemann A.R., Dijkstra D.S. Toward sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part I. Analysis of the primary links of the production chain. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002;42(4):377-401. DOI 10.1016/j.seizure.2016.05.010.
- Lucas M.M., Stoddard F., Annicchiarico P., Frias J., Martínez-Villaluenga C., Sussmann D., Duranti M., Seger A., Zander P., Pueyo J. The future of lupin as a protein crop in Europe. *Front. Plant Sci.* 2015;6:705. DOI 10.3389/fpls.2015.00705.
- Martínez-Villaluenga C., Zieliński H., Frias J., Piskula M.K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chem.* 2009;112:84-88.
- Mikolajczyk J. Genetic studies in *Lupinus angustifolius*. Part III. Inheritance of the alkaloid content, seed hardness and length of the growing season in blue lupin. *Genet. Polonica.* 1966;7(3-4):181-196.
- Mousavi-Derazmahalleh M., Nevado B., Bayer P.E., Filatov D.A., Hane J.K., Edwards D., Erskine W., Nelson M.N. The western Mediterranean region provided the founder population of domesticated narrow-leaved lupin. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(12):2543-2554. DOI 10.1007/s00122-018-3171-x.
- Oomah B.D., Tiger N., Olson M., Balasubramanian P. Phenolics and antioxidative activities in narrowleaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Foods Hum. Nutr. (Dordr).* 2006;61:91-97.
- Otterbach S.L., Yang T., Kato L., Janfeld C., Geu-Flores F. Quinolizidine alkaloids are transported to seeds of bitter narrow-leaved lupin. *J. Exp. Bot.* 2019;70(20):5799-5808. DOI 10.1093/jxb/erz334.
- Philippi J., Schliephake E., Jürgens H., Jansen G., Ordon F. Feeding behavior of aphids on narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) genotypes varying in the content of quinolizidine alkaloids. *Entomol. Exp. Appl.* 2015;156:37-51. DOI 10.1111/eea.12313.
- Plewiński P., Książkiewicz M., Rychel-Bielska S., Rudy E., Wolko B. Candidate domestication-related genes revealed by expression quantitative trait loci mapping of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(22):5670. DOI 10.3390/ijms20225670.
- Pollard N.J., Stoddard F.L., Popineau Y., Wrigley C.W., MacRitchie F. Lupin flours as additives: dough mixing, breadmaking, emulsifying and foaming. *Cereal Chem.* 2002;79:662-669.
- Romeo F.V., Fabroni S., Ballistreri G., Muccilli S., Spina A., Rapisarda P. Characterization and antimicrobial activity of alkaloid extracts from seeds of different genotypes of *Lupinus* spp. *Sustainability.* 2018;10(3):788. DOI 10.3390/su10030788.
- Rychel S., Książkiewicz M., Rudy E., Nelson M., Napanowska B., Wolko B. Genotyping of sequencing of white and narrow leaved lupins. In: Proc. 14th Int. Lupin Conf. Milan, Italy, 2015;154.
- Sedláková K., Straková E., Suchý P., Krejcarová J., Herzig I. Lupin as a perspective protein plant for animal and human nutrition – a review. *Acta Vet. Brno.* 2016;85:165-175. DOI 10.2754/avb201685020165.
- Sengbusch R. Bitterstoffarme Lupinen. *Züchter.* 1931;4:93-109.
- Sengbusch R.V. Suslupinen und Ollupinen. Die Entstehungsgeschichte einiger neuen Kulturpflanzen. *Landw. Jb.* 1942;91:719-880.
- Sgambato S., Passariello N., Paolisso G., Bisesti V., Tesaro P. Effect of sparteine sulphate on insulin secretion in normal men. *Horm. Metab. Res.* 1986;18:686-688.

- Truter W.F., Botha P.R., Dannhauser C.S., Maasdorp B.V., Miles N., Smith A., Snyman H.A., Tainton N.M. Southern African pasture and forage science entering the 21st century: past to present. *Afr. J. Range Forage Sci.* 2015;32(2):73-89.
- Villalpando-Vargas F., Medina-Ceja L. Sparteine as an anticonvulsant drug: evidence and possible mechanism of action. *Seizure.* 2016;39:49-55. DOI 10.1016/j.seizure.2016.05.010.
- Wang S., Errington S., Yap H.H. Studies on carotenoids from lupin seeds. In: *Lupins for Health and Wealth: Proc. New Zealand, 2008*; 198-202.
- Wiedemann M., Gurrola-Díaz C.M., Vargas-Guerrero B., Wink M., García-López P.M., Düfer M. Lupanine improves glucose homeostasis by influencing KATP channels and insulin gene expression. *Molecules.* 2015;20(10):19085-19100. DOI 10.3390/molecules201019085.
- Wink M. Wounding-induced increase of quinolizidine alkaloid accumulation in lupin leaves. *Z. Naturforsch.* 1983;38:905-909. DOI 10.1515/znc-1983-11-1204.
- Wink M. Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Med.* 1987;53:509-582.
- Wink M. Plant breeding: low or high alkaloid content. In: *Proc. 6th Int. Lupin Conf. Geraldton, 1990*;326-334.
- Wink M. The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. In: Bernays E.A. (Ed.). *Insect-Plant Interactions. Vol. IV.* Boca Raton: CRC Press, 1992;131-166.
- Wink M. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In: *The Alkaloids. Vol. 43.* San Diego: Acad. Press, 1993;1-118.
- Wink M., Hartmann T. Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physiol.* 1982;70:74-77. DOI 10.1104/pp.70.1.74.
- Yáñez E. Lupin as a source of protein in human nutrition. In: *Proc. 6th Int. Lupin Conf. Temuco, Chile, 1990*;115-123.
- Yang H., Clements J.C., Li C. Bridge sequencing technologies with crop breeding. In: *Proc. 14th Int. Lupin Conf. Milan, 2015*;8-11.
- Yang H., Tao Y., Zheng Z., Zhang Q., Zhou G., Sweetingham M.W., Howieson J.G., Li C. Draft genome sequence, and a sequence-defined genetic linkage map of the legume crop species *Lupinus angustifolius* L. *PLoS One.* 2013;8(5):e64799. DOI 10.1371/journal.pone.0064799.
- Zachow F. Ein neues Gen für Alkaloidarmut bei *Lupinus angustifolius*. *Züchter.* 1967;37:35-38.

ORCID ID

M.A. Vishnyakova orcid.org/0000-0003-2808-7745
A.V. Kushnareva orcid.org/0000-0002-5709-7961
T.V. Shelenga orcid.org/0000-0003-3992-5353
G.P. Egorova orcid.org/0000-0002-8595-1336

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-016-00072-А) и бюджетного проекта № 0662-2019-0002.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.05.2020. После доработки 04.08.2020. Принята к публикации 06.08.2020.

Районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК, в хромосомах *Macrostomum mirumnovem* – вида, недавно прошедшего полногеномную дупликацию

К.С. Задесенец, Н.Б. Рубцов 

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

 e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Аннотация. Свободноживущий плоский червь *Macrostomum mirumnovem* – неополитиплоидный вид, его геном претерпел недавнюю полногеномную дупликацию (Whole Genome Duplication, WGD). В результате слияния гаплоидного хромосомного набора в его кариотипе произошло формирование двух новых крупных хромосом, MMI1 и MMI2. Создание микродиссекционных ДНК-библиотек, обогащенных повторенными последовательностями ДНК, и их последующая гибридизация *in situ* с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* выявили в этих хромосомах районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК. Разные ДНК-пробы устанавливали в хромосомах *M. mirumnovem* районы, обогащенные разными повторенными последовательностями. Локализация и размер этих районов варьировали в разных копиях крупных хромосом, это предполагало их дивергенцию и снижение уровня гомологии, что может после полной дупликации генома приводить к его редиплоидизации. Помимо возникших *de novo* районов хромосом основного набора, обогащенных повторенными последовательностями, в кариотипе у большинства исследованных особей обнаружены В-хромосомы, которые варьировали по размеру и морфологии. Различия в составе ДНК у этих В-хромосом были показаны с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с полученными микродиссекционными ДНК-пробами на хромосомном материале, взятом от разных животных. Флуоресцентная гибридизация *in situ* этих ДНК-проб по-разному окрашивала В-хромосомы, содержащиеся в кариотипах у разных особей *M. mirumnovem*. Часть В-хромосом интенсивно окрашивалась при проведении FISH, тогда как на других В-хромосомах гибридизационных сигналов не было. Специфический FISH-сигнал отсутствовал даже в прицентромерных районах таких В-хромосом. В настоящей статье обсуждаются возможные механизмы возникновения и последующей эволюции В-хромосом у *M. mirumnovem*. Полученные результаты указывают на важную роль повторенных последовательностей, которую они могут играть в процессе реорганизации генома, приводя к быстрой дифференциации дуплицированных копий хромосом. Высокий уровень внутривидового кариотипического разнообразия по численному и структурному хромосомным перестройкам и по формированию новых хромосомных районов, обогащенных повторенными последовательностями, а также небольшой размер тела (~2 мм) и простота поддержания лабораторных культур *M. mirumnovem* делают этот вид перспективной моделью в исследованиях геномной и кариотипической эволюции видов, недавно прошедших полногеномную дупликацию.


Ключевые слова: микродиссекция метафазных хромосом; ДНК-пробы; повторенные последовательности ДНК; транспозиция мобильных элементов; FISH; амплификация ДНК; В-хромосомы.

Для цитирования: Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК, в хромосомах *Macrostomum mirumnovem* – вида, недавно прошедшего полногеномную дупликацию. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):636-642. DOI 10.18699/VJ20.657

Regions enriched for DNA repeats in chromosomes of *Macrostomum mirumnovem*, a species with a recent Whole Genome Duplication

K.S. Zadesenets, N.B. Rubtsov 

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

 e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Abstract. The free-living flatworm *Macrostomum mirumnovem* is a neopolyploid species whose genome underwent a recent Whole Genome Duplication (WGD). In the result of chromosome fusions of the ancient haploid chromosome set, large metacentric chromosomes were formed. In addition to three pairs of small metacentrics, the current karyotype of *M. mirumnovem* contains two pairs of large metacentric chromosomes, MMI1 and MMI2. The generation of microdissected DNA libraries enriched for DNA repeats followed by DNA probe preparation and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were performed. The DNA probes obtained marked chromosome regions enriched for different DNA repeats in the *M. mirumnovem* chromosomes. The size and localization of these regions varied in different copies

of large chromosomes. They varied even in homologous chromosomes, suggesting their divergence due to genome re-diploidization after a WGD. Besides the newly formed chromosome regions enriched for DNA repeats, B chromosomes were found in the karyotypes of the studied specimens of *M. mirumnovem*. These B chromosomes varied in size and morphology. FISH with microdissected DNA probes revealed that some Bs had a distinct DNA content. FISH could paint differently B chromosomes in different worms and even in the same sample. B chromosomes could carry a bright specific fluorescent signal or could show no fluorescent signal at all. In latter cases, the specific FISH signal could be absent even in the pericentromeric region of the B chromosome. Possible mechanisms of B chromosome formation and their further evolution are discussed. The results obtained indicate an important role that repetitive DNAs play in genome re-diploidization initiating a rapid differentiation of large chromosome copies. Taking together, karyotype peculiarities (a high level of intraspecific karyotypic diversity associated with chromosome number variation, structural chromosomal rearrangements, and the formation of new regions enriched for DNA repeats) and some phenotypic features of *M. mirumnovem* (small body size, short life-cycle, easy maintenance in the laboratory) make this species a perspective model in the studies of genomic and karyotypic evolution in species passed through a recent WGD event.

Key words: metaphase chromosome microdissection; DNA probes; repetitive DNA; mobile element transposition; FISH; DNA amplification; B chromosomes.

For citation: Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Regions enriched for DNA repeats in chromosomes of *Macrostomum mirumnovem*, a species with a recent Whole Genome Duplication. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):636-642. DOI 10.18699/VJ20.657

Введение

Сравнительная геномика открыла новые возможности для изучения механизмов возникновения полногеномной дупликации (Whole Genome Duplication, далее WGD) и последствий такого крупномасштабного изменения генома, затрагивающего практически все гены. Показано, что значительная часть современных видов растений и животных представляет собой результат как минимум одного, а чаще нескольких раундов WGD (Wendel, 2000; Papouliou et al., 2003; Dehal, Boore, 2005). В большинстве филогенетических линий животных они имели место сотни миллионов лет назад, и современные виды представляют собой палеополиплоиды, в геномах которых можно выявить лишь следы WGD (Dehal, Boore, 2005). В связи с этим сравнительный анализ их геномов может дать лишь ограниченные представления о механизмах возникновения WGD и последующих процессах реорганизации дуплицированного генома. Принято считать, что существует два основных механизма прохождения WGD: автополиплоидизация, результатом которой является автотетраплоидный геном, и аллополиплоидизация – удвоение генома организма, возникшего в результате межвидовой гибридизации. В последнем случае сформированный геном содержит геномы обоих родительских видов, т.е. может сохранять многие черты своего гибридного предка. Роль WGD в эволюции генома у животных недавно была подробно рассмотрена в работе (Задесенец, Рубцов, 2018).

Раунды WGD обнаружены в геномах у представителей различных филогенетических линий: грибов, растений, животных. Полученные разными исследовательскими группами данные свидетельствуют о том, что их число существенно отличается в разных таксонах, например у ротифер – 1, у большинства видов позвоночных – 2, у многих видов растений – 3, у лососевых рыб – 4 (Dehal, Boore, 2005; Glasauer, Neuhaus, 2014; Kenny et al., 2018). У репы *Brassica rapa* в геномной эволюции имело место чередование нескольких событий полногеномных дупликаций и даже трипликации всего генома (Moghe et al., 2014). Ряд современных биологов полагает, что WGD могут создавать предпосылки для дальнейших крупных эволюционных преобразований, но некоторые исследователи придерживаются иной точки зрения, считая большинство

пост-WGD видов тупиковой ветвью эволюции (Mayrose et al., 2011; Soltis et al., 2014). К сожалению, из-за отсутствия необходимой методической базы основные исследования долгое время были посвящены полиплоидии и WGD у растений. Появление новых методов молекулярной генетики, совершенствование технологий массового параллельного секвенирования принципиально изменили положение дел в этой области биологии (Задесенец и др., 2017). Возникло новое направление – сравнительная геномика, и все больше видов животных оказывается вовлеченными в эти исследования (Comparative Genomics, 2000). Одна из острых проблем в этой области – крайне небольшое число видов, в эволюции которых WGD произошла относительно недавно (Задесенец, Рубцов, 2018).

Нужно отметить, что большое число полиплоидных вариантов, вероятно, – действительно тупиковые ветви эволюции (Mayrose et al., 2011; Barker et al., 2016), представляющие собой новые, менее конкурентоспособные, по сравнению со своими диплоидными предками, варианты. Тем не менее следы WGD, обнаруженные в геномах практически всех ныне живущих видов, указывают на существенный вклад WGD при формировании принципиально новых механизмов адаптации к условиям окружающей среды (Glasauer, Neuhaus, 2014; Fisher et al., 2018). Несмотря на то, что WGD может быть ключевым событием в формировании новых филогенетических линий, возможности изучения самого феномена WGD и запускаемых им процессов на ранних этапах реорганизации генома в значительной степени ограничены. Стремительный прогресс в развитии новых методов молекулярной генетики и геномики открыл большие возможности и перспективы в исследованиях эволюции на новом, геномном, уровне. Однако число перспективных объектов и моделей для изучения WGD остается очень небольшим. Вовлечение в исследования новых видов, геномы которых были сформированы в результате недавней WGD, становится одной из наиболее актуальных задач. Группа видов свободноживущих плоских червей рода *Macrostomum* может оказаться одной из таких перспективных модельных систем.

Молекулярно-цитогенетический анализ кариотипа и генома *Macrostomum lignano* показал, что основные особенности его организации, отличающие его от кариоти-

пов большинства других видов макростомид, связаны с недавней WGD, которую претерпел геном этого вида в ходе его эволюции (Zadesenets et al., 2017a, b). Кариотипы у большинства представителей рода *Macrostomum* состоят из небольшого числа мелких метацентрических хромосом (Egger, Ishida, 2005; Zadesenets et al., 2016; Schärer et al., 2020). Полагают, что базальным предковым кариотипом служит кариотип $2n = 6$, вследствие WGD число хромосом которого оказалось удвоенным, увеличившись до $2n = 12$, у ряда видов. В результате слияния всех хромосом гаплоидного набора предкового вида в одну хромосомное число *M. lignano* уменьшилось до восьми (Egger, Ishida, 2005; Zadesenets et al., 2016). Более того, в паралогичных районах хромосом *M. lignano* были обнаружены дополнительные различия, которые возникли, скорее всего, уже после WGD (Zadesenets et al., 2017a, b). Установленная нестабильность кариотипа *M. lignano*, вероятно, – также следствие продолжающегося процесса редиплоидизации его генома. Кариотипирование новых видов рода *Macrostomum* привело к открытию нами еще одного вида, геном которого представляет собой результат недавнего независимого раунда WGD, сопровождающегося интенсивной реорганизацией кариотипа, включающей слияния предковых хромосом, структурные хромосомные перестройки, обогащение районов крупных хромосом повторами, а также формирование В-хромосом (Zadesenets et al., 2020). Результаты молекулярно-цитогенетического анализа хромосом *M. mirumnovem* свидетельствуют о том, что расселение и амплификация повторенных последовательностей играют большую роль в реорганизации кариотипа этого вида. Настоящая работа, посвященная анализу распределения в хромосомах *M. mirumnovem* некоторых из таких повторов, основана на создании микродиссекционных ДНК-проб, содержащих главным образом повторенные последовательности ДНК.

Материалы и методы

Лабораторная аутбредная культура свободноживущих червей вида *M. mirumnovem*. В работе использована лабораторная культура *M. mirumnovem*, любезно предоставленная проф. Лукасом Шарером (Зоологический институт Университета Базеля, Швейцария). Особи *M. mirumnovem* культивировали в лаборатории морфологии и функции клеточных структур Института цитологии и генетики СО РАН более года. Первичное кариотипирование было проведено через три месяца после сбора образцов *M. mirumnovem* из природных популяций (Zadesenets et al., 2020). Уже на этом этапе был выявлен высокий уровень кариотипического разнообразия. Наиболее часто встречающийся кариотип состоял из девяти хромосом: непарный, самый крупный метацентрик (ММ11), пара метацентрических хромосом (ММ12), несколько уступающих ему по размеру, и три пары мелких метацентрических хромосом ММ13–ММ15 (Schärer et al., 2020; Zadesenets et al., 2020).

Молекулярно-цитогенетический анализ, включающий получение микродиссекционных полнохромосомных ДНК-проб для всех хромосом *M. mirumnovem* (Задесенец, Рубцов, 2020), показал, что крупные хромосомы ММ11–ММ12 сформировались в результате слияния всех хромосом предкового гаплоидного набора. В сфор-

мированных таким образом хромосомах, вероятно, произошли активное расселение мобильных элементов и амплификация последовательностей ДНК, приведшая к возникновению многочисленных районов, обогащенных повторенными последовательностями (Zadesenets et al., 2020). Мониторинг кариотипа у особей *M. mirumnovem*, выполненный перед проведением микродиссекции мелких метацентриков, обнаружил увеличение кариотипического разнообразия у особей лабораторной культуры и увеличение в ней частоты встречаемости В-хромосом. В нашем исследовании для получения микродиссекционных ДНК-проб брали только метафазные пластинки с кариотипом $2n = 9$. При проведении флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) использовали препараты метафазных хромосом, полученные из особей с различными вариантами кариотипа.

Приготовление препаратов метафазных хромосом. Регулярный мониторинг, включающий кариотипирование индивидуальных особей лабораторной культуры, проводили по описанному ранее стандартному протоколу (Zadesenets et al., 2016). Для каждой кариотипированной особи проанализировано не менее 10 метафазных пластинок. Препараты для осуществления микродиссекции готовили, применяя суспензионный метод, позволяющий добиться лучшей сохранности ДНК диссецируемых хромосом. Для приготовления фиксированной суспензии митотических клеток брали 100 половозрелых особей. Процедуру выполняли согласно стандартной методике, описанной ранее (Zadesenets et al., 2016). Метафазные пластинки распластывали на чистых, влажных холодных покровных стеклах ($60 \times 24 \times 0.17$ мм), что позволяло выполнять микродиссекцию при максимально возможном увеличении инвертированного микроскопа Axiovert 10 (ZEISS, Германия).

Окрашивание метафазных хромосом. При рутинном кариотипировании хромосомы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole solution), растворенным в среде для заключения VECTASHIELD® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, США), содержащей антифейд, в соответствии со стандартным протоколом. Препараты метафазных хромосом, подготовленные для проведения микродиссекции, окрашивали в 2 % растворе красителя Гимза (в однократном фосфатном буфере pH = 7.2, ПанЭко, Москва, РФ) (Задесенец, Рубцов, 2020).

Микроскопический анализ хромосомных препаратов выполнен в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, РФ) с помощью люминесцентного микроскопа AxioPlan 2 (ZEISS, Германия), оснащенного CCD-камерой и комплектом фильтров #49, #10 и #15 (ZEISS). Для регистрации и последующей обработки микроскопических изображений хромосом применяли программное обеспечение ISIS4 (METASystems GmbH, Германия).

Микродиссекция метафазных хромосом и получение микродиссекционных ДНК-проб. Техника микродиссекции метафазных хромосом, примененная для получения ДНК-проб из хромосом разных видов рода *Macrostomum*, описана ранее (Zadesenets et al., 2016). Для амплификации

микроманипуляционно собранного материала метафазных хромосом использовали стандартный вариант сиквенс-независимой амплификации ДНК, как показано ранее (Zadesenets et al., 2017a, b). Процедура микродиссекции от выбора метафазной пластинки до переноса диссектированного материала в пробирку с реакционной смесью подробно представлена в работе (Задесенец, Рубцов, 2020).

В настоящем исследовании собран материал единичных копий двух мелких хромосом. Отличие в приготовлении ДНК-проб от стандартного протокола заключалось в модификации состава коллекционного буфера, в который непосредственно собирали диссектированный хромосомный материал (~40 нл в оттянутом силиконизированном носике Пастеровской пипетки). Коллекционная капля содержала буфер для лизиса белков и фрагментации ДНК (коммерческий буфер из кита Whole Genome Amplification 4 (WGA4) kit, Sigma-Aldrich, США) и 0.1 % неионный детергент Triton X-100 (VWR Life Science AMRESCO, США). Все последующие этапы подготовки ДНК к амплификации и непосредственно амплификация ДНК проведены согласно ранее описанному протоколу (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b) при увеличенном числе циклов ПЦР (35 циклов) на последнем этапе приготовления микродиссекционной ДНК-библиотеки.

Создание микродиссекционных ДНК-библиотек включает два этапа: первый – создание из ДНК диссектированного хромосомного материала фрагментов ДНК, фланкированных соответствующими последовательностями (WGA4 kit, Sigma-Aldrich, США); второй – амплификация таких фрагментов в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В зависимости от эффективности получения фрагментов, фланкированных соответствующими последовательностями на первом этапе, либо в амплификацию вовлекаются последовательности, многократно повторенные в геноме, и значительная часть уникальных и низкоповторенных последовательностей, либо из-за уменьшенной доли последовательностей ДНК, вовлеченных в амплификацию, преимущественно происходит амплификация многократно повторенных последовательностей. Таким образом, при уменьшении эффективности создания фрагментов ДНК, способных к амплификации на первом этапе создания ДНК-библиотек, представленность уникальных последовательностей ДНК в полученных микродиссекционных ДНК-библиотеках значительно уменьшается, а полученные ДНК-библиотеки оказываются обогащенными повторенными последовательностями. Увеличение числа циклов ПЦР на втором этапе создания микродиссекционной ДНК-библиотеки позволяет получить необходимое количество продукта. Модификация коллекционного буфера, использованного на первом этапе создания ДНК-библиотек, обусловила создание ДНК-библиотек,кратно обогащенных высокоповторенными последовательностями, что подтвердило практически полное отсутствие сигнала в большинстве эухроматиновых районов хромосом, после FISH с ДНК-пробами на их основе.

Полученный продукт полимеразной цепной реакции метили в 20 дополнительных циклах ПЦР в присутствии модифицированных нуклеотидтрифосфатов, конъюгированных с флуорохромами: Flu-12-dUTP [fluorescein-5(6)-carboxamidocaproyl-[5(3-aminoallyl)2'-deoxyuri-

dine-5'-Triphosphate] (Биосан, Новосибирск, РФ) или TAMRA-5-dUTP (5-tetramethylrhodamine-dUTP) (Биосан) (Zadesenets et al., 2017a, b). Для мечения использовали кит GenomePlex® Whole Genome Amplification Reamplification kit (WGA3) (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* осуществляли согласно протоколу (Zadesenets et al., 2017a, b), но без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. При проведении FISH анализировали хромосомные препараты, приготовленные из индивидуальных особей *M. mirumnovem*, FISH выполняли как с индивидуальными микродиссекционными ДНК-пробами, так и в варианте двухцветной FISH ДНК-проб S3 и S4. Анализировали не менее чем по 10 особей.

Результаты и обсуждение

Создание ДНК-проб из хромосом *M. mirumnovem* и FISH ДНК-проб с метафазными хромосомами. ДНК-пробы S3 и S4 были получены из диссектированного материала единичных копий двух мелких метацентриков. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ДНК-проб с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* выявила в хромосомах районы, обогащенные повторенными последовательностями, гомологичными фрагментам ДНК, присутствующим в ДНК-пробах S3 и S4 (рис. 1, 2). Далее районы, демонстрирующие специфический сигнал FISH ДНК-пробы S3, будут обозначены как S3D-районы (regions detected by FISH with the S3 DNA probe), а районы FISH ДНК-пробы S4, – как S4D-районы. Точная локализация таких районов в метафазных хромосомах *M. mirumnovem* в нашем исследовании представляла некоторую проблему, обусловленную сложностью описания морфологии и дифференциального окрашивания хромосом этого вида.

На крупных метацентриках, хромосомах ММ1 и ММ2, FISH ДНК-пробы S4 давала интенсивный сигнал точно в районе их первичной перетяжки, а также дополнительные сигналы в плечах этих хромосом (см. рис. 1, а, б и рис. 2). Помимо сигналов в районах крупных хромосом, FISH ДНК-пробы S4 дала интенсивный сигнал в прицентромерном районе хромосомы ММ4, а у некоторых исследованных особей также в дистальном районе q-плеча этой хромосомы (см. рис. 1, а, б и 2, в). Слабые сигналы (на грани возможности их выявления) были также отмечены в прицентромерных районах хромосом ММ3 и ММ5. Из-за небольшого размера блока прицентромерного структурного гетерохроматина в хромосомах *M. mirumnovem* нельзя сделать окончательного заключения о локализации S4D-районов непосредственно в прицентромерном гетерохроматине или прилежащих к нему эухроматиновых районах даже в хромосомах ММ1 и ММ2. Локализация гибридизационного сигнала в конденсированных метафазных хромосомах ММ3–ММ5 часто оказывалась еще более осложненной (см. рис. 1, а–г). Следует отметить, что на менее конденсированных копиях хромосом ММ3–ММ5 с выраженной первичной перетяжкой гибридизационный сигнал ДНК-пробы S4 всегда был локализован в ее районе (см. рис. 2, в).

Таким образом, учитывая небольшой размер прицентромерного блока гетерохроматина, приходится признать,

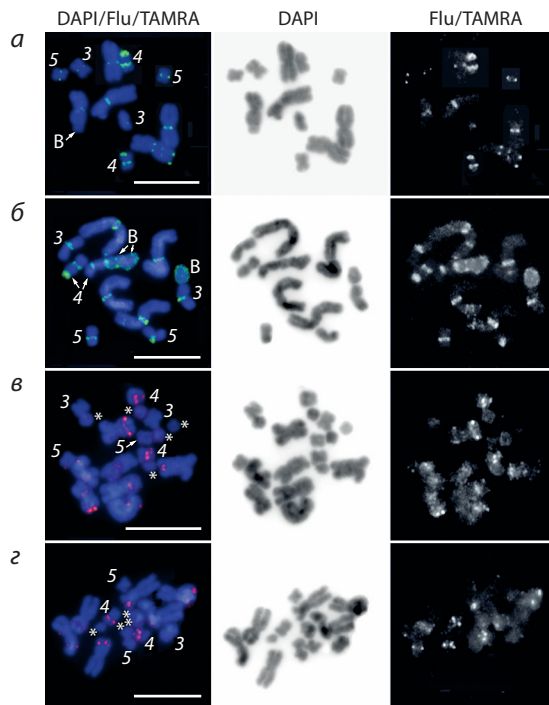


Рис. 1. Флуоресцентная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб S3 (красный сигнал) и S4 (зеленый сигнал) с метафазными хромосомами разных особей *M. mirumnovem*, хромосомы которых отличаются размером районов, обогащенных повторенными последовательностями (а–в). Представлены также инвертированные изображения DAPI-окрашивания и раздельная регистрация флуорохромов Flu/TAMRA.

Обозначены хромосомы MMI3–MMI5 (3–5 соответственно) и В-хромосома. Звездочками отмечены предполагаемые В-хромосомы (мелкие хромосомы, по размеру или морфологии отличные от хромосом MMI3–MMI5). Цифрами обозначены номера хромосом. Масштабная линейка 10 мкм.

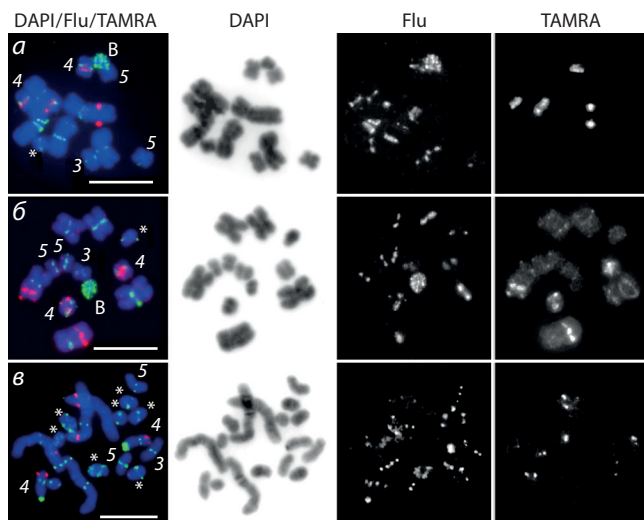


Рис. 2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб S3 (красный сигнал) и S4 (зеленый сигнал) с метафазными хромосомами высокого (а, б) и низкого (в) уровней конденсации. Представлены метафазные пластинки разных особей *M. mirumnovem*, хромосомы которых отличаются размером районов, обогащенных повторенными последовательностями (а–в). Продемонстрированы инвертированные изображения DAPI-окрашивания и раздельная регистрация флуорохромов Flu и TAMRA.

Обозначения см. на рис. 1.

что вопрос, локализованы ли S4D-районы в прицентромерном гетерохроматине хромосом или в проксимальном эухроматиновом районе одного из хромосомных плеч, остается открытым. Для простоты дальнейшего описания полученных результатов мы будем называть эти районы прицентромерными, осознавая некоторую некорректность использования терминологии в описании результатов FISH с ДНК-пробой S4, можно сказать, что она давала сигналы в прицентромерных районах всех А-хромосом, хотя их интенсивность в разных районах хромосом значительно варьировала, меняясь от интенсивного сигнала в районе первичной перетяжки некоторых копий хромосом MMI1, MMI2 и MMI4 до слабых отдельных сигналов на разных хроматидах небольших метацентрических хромосом MMI3 и MMI5 (см. рис. 1, а, б). Варьирование интенсивности сигнала ДНК-пробы S4 в районах хромосом, включая разные копии гомологичных хромосом, вероятно, обусловлено различиями в количестве копий соответствующих повторов в этих районах. Нельзя исключить также, что в некоторых случаях такие вариации в интенсивности сигнала FISH могут быть обусловлены неполной гомологией повторенных последовательностей в этих районах и фрагментов ДНК в составе ДНК-пробы S4. Необходимо отметить, что кроме специфических сигналов в районах А-хромосом, FISH ДНК-пробы S4 слабо окрашивала некоторые В-хромосомы (см. рис. 1, б и 2, а, б).

Интенсивные специфические FISH-сигналы ДНК-пробы S3 были отмечены только в районах хромосомы MMI4 и в районах крупных метацентрических хромосом (MMI1 и MMI2). Причем двухцветная FISH ДНК-проб S3 и S4 показала, что они обогащены различными высокоповторенными последовательностями, так как не выявлено ни одного района совместной локализации S3D- и S4D-районов (см. рис. 2, а–в). Районы S3D и S4D в проксимальном районе хромосомы MMI4 локализованы близко друг к другу, однако и в этом случае колокализации сигналов FISH ДНК-проб S3 и S4 не наблюдали. Более того, у одной из особей, молекулярно-цитогенетический анализ которых был выполнен в настоящем исследовании, обнаружено смещение S3D-района в дистальный район р-плеча хромосомы MMI4, что хорошо видно на слабоконденсированных хромосомах (см. рис. 2, в). Вероятно, изменение локализации S3D-района обусловлено инверсией с одной из точек разрыва, локализованной между S3D- и S4D-районами, что, помимо перемещения S3D-района, привело к значительному увеличению расстояния между ними. Таким образом, полученные результаты двухцветной FISH указывают на то, что при создании ДНК-библиотек S3 и S4 в амплификацию были вовлечены разные повторенные последовательности хромосомы MMI4.

Сигналы FISH ДНК-пробы S3 в районах мелких метацентриков MMI3 и MMI5 были очень низкой интенсивности, лишь немного превышающей неспецифической флуоресценции. Мы полагаем, что эти районы либо содержали относительно небольшое число повторов, гомологичных ДНК микродиссекционной ДНК-пробы S3, либо присутствующие в них повторы имели более низкий уровень гомологии с ДНК этой пробы.

В плечах некоторых крупных метацентрических хромосом присутствовали районы, в которых после FISH с ДНК-пробой S3 был зарегистрирован флуоресцентный сигнал, по интенсивности и размеру превосходящий сигнал в проксимальном районе хромосомы ММ14 (см. рис. 1, а–г и 2, а–в). Необходимо отметить, высокую вариабельность интенсивности флуоресцентного сигнала в крупных хромосомах. В метафазных пластинках у исследованных образцов присутствовали как крупные хромосомы, в районах которых были очень интенсивные сигналы, так и их гомологи, в районах которых уровень интенсивности специфического сигнала сопоставим с таковым в районах хромосом ММ13 и ММ15 (см. рис. 1 и 2).

Возможные механизмы возникновения районов, обогащенных повторенными последовательностями, и их последующей эволюции. Вопрос о молекулярных механизмах формирования вариабельности размеров, локализации и обогащенности районов повторами, выявляемыми с помощью ДНК-проб S3 и S4, остается открытым. Однако, рассматривая его, необходимо вспомнить, что в составе хромосом ММ11 и ММ12 есть протяженные районы гомологии с участками хромосомы ММ14 (Zadesenets et al., 2020). Варьирование S3D- и S4D-районов по локализации и размеру в хромосомах ММ11 и ММ12, а также их отсутствие в плечах хромосом ММ13 и ММ15 позволяют предположить, что они представляют собой результат амплификации последовательностей ДНК, существовавших еще в предковой хромосоме, слияние которой с другими хромосомами предкового кариотипа и стало причиной возникновения крупных метацентрических хромосом ММ11 и ММ12. Распространение таких районов внутри хромосомы может происходить в результате инверсий. В пользу последнего предположения свидетельствует изменение локализации S3D-района в хромосоме ММ14 у одного из анализируемых образцов (см. рис. 2, в).

На основании полученных в нашем исследовании результатов не представляется возможным оценить, сколько и какие повторенные последовательности входят в состав полученных ДНК-проб. В последующих работах ответ на этот вопрос может быть получен при клонировании фрагментов ДНК из созданных микродиссекционных ДНК-библиотек и последующей FISH ДНК-проб, приготовленных из этих фрагментов ДНК. Ранее такой подход был успешно применен для анализа состава ДНК В-хромосомы одного из видов саранчовых, *Podisma kanoi* (Bugrov et al., 2007). Альтернативный вариант изучения состава ДНК полученных ДНК-библиотек – их массовое параллельное секвенирование – ранее был использован для выяснения состава ДНК В-хромосом восточноазиатской лесной мыши, *Apodemus peninsulae*, В-хромосом желтогорлой мыши, *Apodemus flavicollis*, и малой сверхчисленной маркерной хромосомы человека (Makunin et al., 2018). Однако при таком дизайне эксперимента результаты массового параллельного секвенирования должны быть верифицированы с помощью ДНК-проб, созданных на основе полученных секвенсов, так как в микродиссекционных ДНК-пробах всегда присутствует некоторое количество контаминирующей их ДНК. Кроме того, для успешной и эффективной интерпретации результатов секвенирования и описания обнаруженных повторенных

последовательностей желательна наличие референсной сборки генома изучаемого вида (Задесенец и др., 2017), получение которых, в случае *M. mirumnovem*, весьма проблематично ввиду высокой нестабильности кариотипа и генома этого вида.

В-хромосомы *M. mirumnovem*. Как было отмечено выше, помимо районов А-хромосом, FISH ДНК-пробы S4 также специфично окрашивала некоторые В-хромосомы (см. рис. 1, б и 2, а–в). Эти результаты позволяют предложить один из сценариев формирования таких В-хромосом: они сформировались из прицентромерного района одной из А-хромосом в результате хромосомных разрывов, приводящих к возникновению маленькой сверхчисленной хромосомы, состоящей из прицентромерного района исходной хромосомы, и последующей амплификации повторенных последовательностей ДНК как гомологичных ДНК микродиссекционной ДНК-пробы, так и других повторенных последовательностей. На наличие таких ДНК-повторов в составе В-хромосомы указывает ее неравномерное и не очень интенсивное окрашивание при проведении FISH ДНК-пробы S4. Эти повторы могут происходить как из прицентромерного района хромосомы-предшественника соответствующих В-хромосом, так и иметь иное происхождение. Часть В-хромосом не давала никакого специфического сигнала после FISH с ДНК-пробой S4. Специфический сигнал флуоресцентной гибридизации *in situ* отсутствовал даже в прицентромерных районах этих хромосом (см. рис. 1, а), что свидетельствует об амплификации разных типов повторенных последовательностей ДНК при формировании В-хромосом, а, возможно, и о разном происхождении.

Заключение

С помощью микродиссекционных ДНК-проб, полученных по модифицированному протоколу и содержащих преимущественно повторенные последовательности ДНК, нам удалось выявить в хромосомах *M. mirumnovem* районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК. Оказалось, что обогащение таких хромосомных районов повторенными последовательностями может значительно варьировать. Возникновение и последующие изменения в таких районах в крупных метацентрических хромосомах ММ11 и ММ12 могут приводить к дивергенции копий гомологичных хромосом. Кроме того, полученные результаты указывают на то, что состав ДНК в разных копиях В-хромосом у особей вида *M. mirumnovem* может различаться. В формировании, по крайней мере, некоторых В-хромосом принимали участие повторенные последовательности, гомологичные повторам из проксимальных районов А-хромосом.

Список литературы / References

- Задесенец К.С., Ершов Н.И., Рубцов Н.Б. Полногеномное секвенирование геномов: от секвенирования фрагментов ДНК к сборке генома. *Генетика*. 2017;53(6):641-650. DOI 10.7868/S0016675817050137.
- [Zadesenets K.S., Ershov N.I., Rubtsov N.B. Whole-genome sequencing of eukaryotes: from sequencing of DNA fragments to a genome assembly. *Russ. J. Genet.* 2017;53(6):631-639. DOI 10.1134/S102279541705012X.]

- Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Дупликация генома в эволюции генома животных. *Генетика*. 2018;54(10):1107-1119. DOI 10.1134/S0016675818090163.
[Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Genome duplication in animal evolution. *Russ. J. Genet.* 2018;54(10):1125-1136. DOI 10.1134/S1022795418090168.]
- Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-о.
[Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes in case of an impossibility of chromosomes identification by routine staining. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-о.]
- Barker M.S., Husband B.C., Pires J.C. Spreading wing and flying high: the evolutionary importance of polyploidy after a century of study. *Am. J. Bot.* 2016;103(7):1-7. DOI 10.3732/ajb.1600272.
- Bugrov A.G., Karamysheva T.V., Perepelov E.A., Elisaphenko E.A., Rubtsov D.N., Warchalowska-Sliwa E., Tatsuta H., Rubtsov N.B. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Res.* 2007;15(3):315-326. DOI 10.1007/s10577-007-1128-z.
- Comparative Genomics. Sankoff D., Nadeau J.H. (Eds.). Kluwer Academic Publ., 2000. DOI 10.1007/978-94-011-4309-7.
- Dehal P., Boore J.L. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* 2005;3:e314. DOI 10.1371/journal.pbio.0030314.
- Egger B., Ishida S. Chromosome fission or duplication in *Macrostomum lignano* (Macrostomorpha, Plathelminthes) – remarks on chromosome numbers in ‘archoophoran turbellarians’. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2005;43(2):127-132. DOI 10.1111/j.1439-0469.2005.00300.x.
- Fisher K.J., Buskirk S.W., Vignogna R.C., Marad D.A., Lang G.I. Adaptive genome duplication affects patterns of molecular evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2018;14(5):e1007396. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007396>.
- Glasauer S.M.K., Neuhauss S.C.F. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics.* 2014;289(6):1045-1060. DOI 10.1007/s00438-014-0889-2.
- Kenny N.J., Chan K.W., Nong W., Qu Z., Maeso I., Yip H.Y., Chan T.F., Kwan H.S., Holland P.W.H., Chu K.H., Hui J.H.L. Ancestral whole-genome duplication in the marine chelicerate horseshoe crabs. *Heredity*. 2018;116(2):190-199. DOI 10.1038/hdy.2015.89.
- Makunin A.I., Rajičić M., Karamysheva T.V., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Blagojević J., Vujošević M., Rubtsov N.B., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Low-pass single-chromosome sequencing of human small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) and *Apodemus* B chromosomes. *Chromosoma*. 2018;127(3):301-311. DOI 10.1007/s00412-018-0662-0.
- Mayrose I., Zhan S.H., Rothfels C.J., Magnuson-Ford K., Barker M.S., Rieseberg L.H., Otto S.P. Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*. 2011;60(333):1257. DOI 10.1126/science.1207205.
- Moghe G.D., Hufnagel D.E., Tang H., Xiao Y., Dworkin I., Town C.T., Conner J.K., Shiu S.-H. Consequences of whole-genome triplication as revealed by comparative genomic analyses of the wild radish *Raphanus raphanistrum* and three other Brassicaceae species. *Plant Cell*. 2014;26(5):1925-1937. DOI 10.1105/tpc.114.124297.
- Panopoulou G., Hennig S., Groth D., Krause A., Poustka A.J., Herwig R., Vingron M., Leirach H. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Res.* 2003;13:1056-1066. DOI 10.1101/gr.874803.
- Schärer L., Brand J.N., Singh P., Zadesenets K.S., Stelzer C.-P., Viktorin G. A phylogenetically informed search for an alternative *Macrostomum* model species with notes on taxonomy, mating behavior, karyology, and genome size. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2020;58:41-65. DOI 10.1111/jzs.12344.
- Soltis D.E., Segovia-Salcedo M.C., Jordon-Thaden I., Majure L.C., Miles N.M., Mavrodiev E.V., Mei W., Cortez M.B., Soltis P.S., Gitzendanner M.A. Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of Mayrose et al. *New Phytol.* 2014;202(4):1105-1117. DOI 10.1111/nph.12756.
- Wendel J.F. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 2000;42:225-249. DOI 10.1023/A:1006392424384.
- Zadesenets K.S., Ershov N.I., Berezikov E., Rubtsov N.B. Chromosome evolution in the free-living flatworms: first evidence of intrachromosomal rearrangements in karyotype evolution of *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida). *Genes*. 2017a;8:298. DOI 10.3390/genes8110298.
- Zadesenets K.S., Jetybayev I.Y., Schärer L., Rubtsov N.B. Genome and karyotype reorganization after whole genome duplication in free-living flatworms of the genus *Macrostomum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:680. DOI 10.3390/ijms21020680.
- Zadesenets K.S., Schärer L., Rubtsov N.B. New insights into the karyotype evolution of the free-living flatworm *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Sci. Rep.* 2017b;7:6066. DOI 10.1038/s41598-017-06498-0.
- Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One*. 2016;11:e0164915. DOI 10.1371/journal.pone.0164915.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда, № 19-14-00211. Авторы благодарят проф. Л. Шарера за предоставление образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.12.2019. После доработки 25.05.2020. Принята к публикации 25.05.2020.

Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами

Г.С. Риттер¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, А.С. Проскурина¹, П.Э. Кисаретова¹, О.С. Таранов³, Т.Д. Дубатолова⁴, Е.В. Долгова¹, Е.А. Поттер¹, С.С. Кирикович¹, Я.Р. Ефремов^{1,2}, С.И. Байбородин^{1,2}, М.В. Романенко², М.И. Мещанинова⁵, А.Г. Веньямина⁵, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹ ✉

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁵ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: labmolbiol@mail.ru

Аннотация. В работе охарактеризованы некоторые биологические особенности радиопротекторного действия препарата двуцепочечной РНК. Обнаружено, что препарат дрожжевой РНК обладает пролонгированным радиопротекторным действием при облучении животных летальной дозой в 9.4 Гр. При облучении через 1 ч и на 4-е сутки после введения 7 мг препарата РНК выживает 100 % животных на 70-е сутки наблюдения, при облучении на 8-е и 12-е сутки – 60 % животных. Были оценены временные параметры процесса репарации двуцепочечных разрывов, индуцированных γ -лучами. Выявлено, что введение препарата РНК в момент максимального количества двуцепочечных разрывов, через 1 ч после облучения, снижает эффективность радиопротекторного действия по сравнению с введением за 1 ч до облучения и через 4 ч после облучения. Проведено сравнение эффективности радиозащитного действия штатного радиопротектора Б-190 и препарата РНК в одном эксперименте. Установлено, что препарат суммарной РНК не уступает по эффективности препарату Б-190. Выживаемость на 40-е сутки после облучения для группы мышей, получавших препарат РНК, составила 78 %, для Б-190 – 67 % животных. В ходе аналитических исследований препарата суммарной РНК дрожжей обнаружилось, что препарат представляет собой смесь одноцепочечной и двуцепочечной РНК. Радиопротекторными свойствами обладает только двуцепочечная РНК. При введении 160 мкг препарата двуцепочечной РНК выживает 100 % подопытных животных после абсолютно летальной дозы гамма-радиации 9.4 Гр. Установлено, что радиозащитный эффект двуцепочечной РНК зависит не от последовательности, а от ее двуцепочечной формы, причем для осуществления радиопротекторного действия двуцепочечная РНК должна иметь «открытые» концы молекулы. Предполагается, что радиозащитное действие препарата двуцепочечной РНК связано с участием молекул РНК в корректном восстановлении поврежденного облучением хроматина в стволовых клетках крови. Сохранившие жизнеспособность стволовые гемопоэтические клетки мигрируют на периферию и достигают селезенки, где активно пролиферируют. Вновь образовавшаяся клеточная популяция восстанавливает кроветворную и иммунную системы, что определяет выживание летально облученных животных. Ключевые слова: двуцепочечная РНК; Б-190; селезеночные колонии; двуцепочечные разрывы.

Для цитирования: Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Кисаретова П.Э., Таранов О.С., Дубатолова Т.Д., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Романенко М.В., Мещанинова М.И., Веньямина А.Г., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6): 643-652. DOI 10.18699/VJ20.658

Characteristic of the active substance of the *Saccharomyces cerevisiae* preparation having radioprotective properties

G.S. Ritter¹, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, A.S. Proskurina¹, P.E. Kisaretova¹, O.S. Taranov³, T.D. Dubatolova⁴, E.V. Dolgova¹, E.A. Potter¹, S.S. Kirikovich¹, Y.R. Efremov^{1,2}, S.I. Bayborodin^{1,2}, M.V. Romanenko², M.I. Meschaninova⁵, A.G. Venyaminova⁵, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹ ✉

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁴ Institute of Molecular and Cellular Biology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁵ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: labmolbiol@mail.ru

Abstract. The paper describes some biological features of the radioprotective effect of double-stranded RNA preparation. It was found that yeast RNA preparation has a prolonged radioprotective effect after irradiation by a lethal dose of 9.4 Gy. 100 % of animals survive on the 70th day of observation when irradiated 1 hour or 4 days after 7 mg RNA preparation injection.

© Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Кисаретова П.Э., Таранов О.С., Дубатолова Т.Д., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Романенко М.В., Мещанинова М.И., Веньямина А.Г., Колчанов Н.А., Богачев С.С., 2020

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

tion, 60 % animals survive when irradiated on day 8 or 12. Time parameters of repair of double-stranded breaks induced by gamma rays were estimated. It was found that the injection of the RNA preparation at the time of maximum number of double-stranded breaks, 1 hour after irradiation, reduces the efficacy of radioprotective action compared with the injection 1 hour before irradiation and 4 hours after irradiation. A comparison of the radioprotective effect of the standard radioprotector B-190 and the RNA preparation was made in one experiment. It has been established that the total RNA preparation is more efficacious than B-190. Survival on the 40th day after irradiation was 78 % for the group of mice treated with the RNA preparation and 67 % for those treated with B-190. In the course of analytical studies of the total yeast RNA preparation, it was found that the preparation is a mixture of single-stranded and double-stranded RNA. It was shown that only double-stranded RNA has radioprotective properties. Injection of 160 µg double-stranded RNA protects 100 % of the experimental animals from an absolutely lethal dose of gamma radiation, 9.4 Gy. It was established that the radioprotective effect of double-stranded RNA does not depend on sequence, but depends on its double-stranded form and the presence of "open" ends of the molecule. It is supposed that the radioprotective effect of double-stranded RNA is associated with the participation of RNA molecules in the correct repair of radiation-damaged chromatin in blood stem cells. The hematopoietic pluripotent cells that have survived migrate to the periphery, reach the spleen and actively proliferate. The newly formed cell population restores the hematopoietic and immune systems, which determines the survival of lethally irradiated animals.

Key words: double-stranded RNA; B-190; spleen colonies; double-stranded breaks.

For citation: Ritter G.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Kisaretova P.E., Taranov O.S., Dubatolova T.D., Dolgova E.V., Potter E.A., Kirikovich S.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Romanenko M.V., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Characteristic of the active substance of the *Saccharomyces cerevisiae* preparation having radioprotective properties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):643-652. DOI 10.18699/VJ20.658 (in Russian)

Введение

Ионизирующее излучение воздействует на живой организм таким образом, что приводит к повреждению его функциональных систем и гибели. В настоящее время считается, что ионизирующее излучение оказывает наибольшее воздействие на мембранные структуры и ядро клетки. Лизис мембран приводит к разрушению структуры клетки, а дефекты в ядерной ДНК ведут к нарушению интегральной функциональной целостности хроматина, атипическому течению клеточного деления, появлению хромосомных aberrаций и апоптозу (Dent et al., 2003). Основными клетками-мишенями для гамма-лучей являются низкодифференцированные клетки костного мозга, зародышевые клетки семенников, кишечный и кожный эпителий (Bergonié, Tribondeau, 2003; Vogin, Foray, 2013). Радиочувствительность всего организма у млекопитающих приравнивается к радиочувствительности кроветворных клеток, так как их аплазия, возникающая после общего облучения минимальной абсолютно смертельной дозой, приводит к гибели организма.

Под радиозащитным или радиопротекторным эффектом понимают снижение частоты и тяжести постлучевых повреждений биомолекул и (или) стимуляцию процессов их пострадиационной репарации. Наиболее эффективные радиопротекторы относятся к двум классам химических соединений (Patt et al., 1949; Fridovich, 1995). Это серосодержащие радиозащитные вещества (аминотиолы), выполняющие функцию «молекулярных ловушек» свободных радикалов, и производные индолилалкиламинов: агонисты биологически активных аминов, способные через специфические клеточные рецепторы вызывать острую гипоксию и угнетение метаболизма в радиочувствительных тканях (Ward, 1988; Dent et al., 2003; Wang et al., 2013).

Как было сказано ранее, наиболее губительное воздействие ионизирующее излучение оказывает на молекулу ДНК ядерного хроматина. Повреждения хромосом, следующий за этим aberrантный митоз и гибель клетки – это еще один механизм циторедукующего действия иони-

зирующего излучения. При воздействии активных метаболитов на ДНК хроматина возникают все возможные из описанных в литературе повреждения этих молекул. Наиболее фатальными считаются двуцепочечные разрывы (ДЦР). Если в клетке нарушены системы репарации таких повреждений, то клетка запускает механизмы самоуничтожения.

В настоящем исследовании описывается новый принцип радиопротекторного действия, не связанный с протекцией от непосредственно γ -кванта и с ограничением воздействия оксидативного стресса, вызываемого вторичными радикалами, а характеризующийся успешным пострадиационным восстановлением стволовых гемопоэтических предшественников, обусловленным участием в репаративном процессе фрагментов экстраклеточной двуцепочечной нуклеиновой кислоты. Такое введение в репаративный процесс внешнего «корректора» в конечном итоге определяет восстановление кроветворной и иммунной системы и сохранение жизнеспособности облученного организма.

Материалы и методы

Животные. В работе были использованы трехмесячные мыши линий СВА/Лас, С57ВL и СС57ВR (самцы и самки, 18–22 г) разведения вивария Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН. Животные содержались в группах по 6–10 мышей на клетку со свободным доступом к пище и воде.

Облучение экспериментальных животных проводили на γ -установке (источник Cs^{137} ИГО 1, Россия) дозой 9.4 Гр при мощности дозы 0.74–1.4 Гр/мин. Подопытных и контрольных мышей облучали группами по 9–10 животных в контейнере размером 20 × 20 × 40 см. Радиопротекторное действие препарата суммарной РНК дрожжей (НПО «Биолар», Россия) оценивали по гибели экспериментальных животных в промежутках времени до 30–90 сут. Препарат суммарной РНК дрожжей и двуцепочечная РНК вводились мышам однократно внутривенно

до облучения в количестве, отдельно указанном для каждого эксперимента. Оценка количества селезеночных колоний после фиксации органа в 4 % параформальдегиде проводилась на 9–12-е сутки после облучения.

Выделение фракций препарата РНК. Хроматография препарата РНК выполняли на колонке объемом 10 мл, диаметром 1 см. Сухой гидроксиапатит (ГАП) подвергали набуханию в 10 мл воды, после чего заполняли колонку. Колонку промывали 30 мл 0.01 М PBS. Наносили на колонку раствор РНК и промывали 30 мл 0.01 М PBS. Элюировали РНК 0.15 М PBS, затем промывали 0.18 М PBS и повторно элюировали нуклеиновые кислоты 0.25 М PBS. Полученный при хроматографии раствор РНК в PBS диализовали против ТЕ-буфера (H_2O , обработанная DEPC; 10 mM Tris-HCl, 10 mM ЭДТА, pH 7.4) при +4 °C в течение суток с двумя сменами буфера. Электрофорез препаратов нуклеиновых кислот проводился в 1 % или 1.5 % агарозном геле с содержанием 2 мкг/мл бромистого этидия в трис-ацетатном буфере.

Выделение клеток костного мозга. Клетки костного мозга мышей вымывали из трубчатых костей средой RPMI-1640, тщательно ресуспендировали. Суспензию аккуратно наслаивали на 3 мл смеси фикола-урографина (15 % урографин, 7 % фикола, $\rho = 1.119$), центрифугировали при 400 g, 4 °C в течение 40 мин. После центрифугирования вся клеточная масса разделялась на клетки, составляющие интерфазное кольцо (моноклеары) и осадок. Моноклеары отбирали в новую пробирку, промывали 4 мл RPMI-1640 и осаждали центрифугированием при 400 g, 4 °C в течение 5 мин.

Анализ репаративного цикла в клетках костного мозга. Через 30, 60 и 120 мин после облучения мышей линии СВА абсолютно летальной дозой 9.4 Гр из трубчатых костей выделяли клетки костного мозга. Анализ репаративного цикла по количеству ДЦР осуществляли методом «кометных хвостов» или при помощи антител к гистону γ -H2aX, как описано в работе (Dolgova et al., 2014). Длину «кометных хвостов» (TM – tail moment) оценивали в программе CASP и ImageJ. Образцы, окрашенные антителами к гистону γ -H2aX, анализировали при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSAria в ЦКП проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН. Значения, полученные после анализа 50–100 кометных хвостов, были нормированы к показателям, определенным в 30-й минуте, и усреднены.

Патоморфологический анализ органов. Органы фиксировались в 4 % формальдегиде и заливались в парафиновые блоки. Парафиновые срезы проводились через серию спиртов и окрашивались гематоксилином-эозином.

Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата суммарной РНК дрожжей и штатного радиопротектора Б-190. В качестве препарата сравнения использовали радиопротектор Б-190 (ФГУП НПЦ «Фармазащита» ФМБА России). Препарат Б-190 вводили мышам за 20 мин до облучения перорально в количестве 2.5 мг/мышь в объеме 0.25 мл. Препарат суммарной РНК вводили мышам за 60 мин до облучения внутривенно в количестве 7 мг/мышь в объеме 0.5 мл (0.15 М PBS). Сравняли выживаемость животных после облучения дозой 9.4 Гр, делали патоморфологический анализ органов.

Качественная реакция на ДНК (реакция Дише). Метод основан на способности дезоксирибозы образовывать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот (Dische, 1957). С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание. Дифениламиновый реактив представляет собой 1 % (W/V) раствор дифениламина в смеси ледяной уксусной кислоты и 2.75 % (W/V) концентрированной серной кислоты ($p_{20} = 1.836$). К осадку нуклеиновых кислот добавляют 0.5 мл раствора едкого натра (0.1 М) и приливают равный объем дифениламинового реактива. Раствор нагревают в течение 15–20 мин на кипящей водяной бане. Появляется характерное для субстрата окрашивание.

Клонирование кДНК копий молекул РНК, элюирующихся с ГАП 0.25 М PBS. Для получения кДНК с РНК использовали систему ревертазного синтеза и набор DOP-PCR master kit («Медиген»). кДНК копии клонировали в плазмидном векторе Bluescript (НПО «Вектор») после «полировки» концов фрагментов с помощью Pfu полимеразы и трансформировали в электрокомпетентные клетки XL1-Blue MRF. Штамм *E. coli* XL1-Blue MRF любезно предоставлен лабораторией иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. После анализа электрофоретической подвижности ДНК, выделенной из полученных трансформантов, отобранные клоны были секвенированы с использованием протокола фирмы Applied Biosystems (США) при помощи автоматического ДНК секвенатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с 8-канальным капиллярным блоком. Секвенированные клоны анализировались в программе Vector NTI. Последовательности были выравнены и собраны в группы гомологии. Контекстный анализ проводили на сайте <http://genome.ucsc.edu>, используя инструмент Vlat.

Результаты

Радиопротекторное действие суммарной дрожжевой РНК

Было проанализировано 10 различных серийных препаратов дрожжевой суммарной РНК на ее способность защищать животных от летальной дозы γ -радиации. Обнаружено, что радиозащитный эффект препарата прямо не связан с процентным содержанием РНК и белка в препарате. Оценена длительность радиозащитного действия препарата. Для этого очищенная стерильная РНК дрожжей в количестве 7 мг вводилась экспериментальным мышам линии C57BL за час, за сутки, за 4, 8 и 12 сут до облучения летальной дозой радиации 9.4 Гр. Оказалось, при облучении через 1 ч и на 4-е сутки от введения препарата РНК выживает 100 % животных на 70-е сутки наблюдения, при облучении на 8-е и 12-е сутки – 60 % животных (Риттер и др., 2018).

Состояние экспериментальных животных, выживших после летальных доз γ -радиации в отдаленные сроки после проведенного облучения, свидетельствовало о значительных нарушениях в клетках, формирующих кожный покров мышей. В течение 50–150 дней после обработки мыши прогрессивно седали (рис. 1, а). Анализ развития селезеночных колоний после облучения, проведенного на

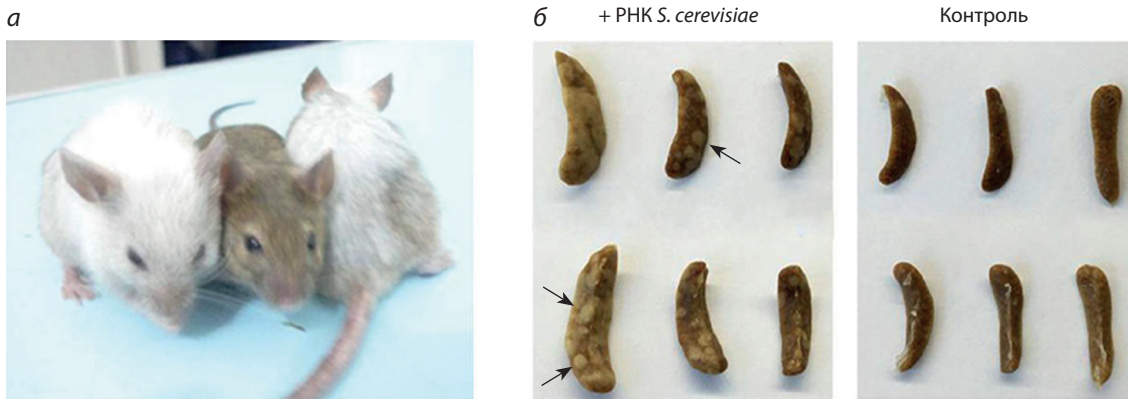


Рис. 1. Радиопротекторное действие препарата РНК при облучении мышей абсолютно летальной дозой радиации 9.4 Гр. *а* – фенотипическое сравнение мышей СВА, облученных через час после введения препарата РНК (по бокам), и интактной мыши (в центре) через 150 дней после облучения; *б* – селезеночные колонии, сформированные у животных, обработанных препаратом РНК, и у контрольных животных, выявляемые на 9–12-й день после проведенного облучения. Стрелками указаны лейкоцитарные колонии, являющиеся критерием выживаемости экспериментальных мышей.

9–12-е сутки после воздействия, предполагал, что главной мишенью воздействия препарата РНК являлись стволовые клетки крови костного мозга (см. рис. 1, б). Спасенные от разрушения ионизирующим облучением гемопоэтические предшественники способны выходить на периферию и заполнять опустошенные вследствие обработки радиацией иммунокомпетентные органы, например селезенку. В результате мобилизации спасенных стволовых клеток крови в белой пульпе селезенки формируются селезеночные колонии, из которых развивается новая иммунная и кроветворная системы организма взамен разрушенных радиацией.

Радиотерапевтическое действие препарата суммарной РНК дрожжей, ориентированное на временные параметры цикла репарации ДЦР в клетках костного мозга мышей, индуцированных гамма радиацией

Известно, что γ -радиация индуцирует разрушение хроматина в клетках костного мозга и в том числе в стволовых клетках крови, что и приводит к развитию лучевой болезни и гибели организма (Goodhead, 1994; Belli et al., 2002; Morgan, 2003a, b; Shemetun, Pilinska, 2019). Основным повреждением хромосом являются ДЦР, некорректное восстановление которых приводит к aberrантному митозу и апоптозу. В этой связи в начальных экспериментах были оценены временные параметры процесса репарации ДЦР, индуцированных γ -лучами. Мыши подвергались воздействию летальной дозы облучения 9.4 Гр, клетки костного мозга вымывались через 30, 60 и 120 мин после облучения. Количество ДЦР оценивали «методом комет» или по свечению специфических антител к гистону γ H2AX (Rogakou et al., 1998, 1999; Maréchal, Zou, 2013). Результаты измерений суммированы в графике на рис. 2, а.

Установлено, что основной пик накопления ДЦР приходится на 60 мин от получения дозы радиации 9.4 Гр. К 120 мин и в более поздние сроки наблюдается практически полное восстановление целостности хроматина, тем не менее кривая не опускается до значений, полученных до облучения (данные не приводятся). Этот факт позволяет предполагать, что в указанный отрезок времени

детектируются ДЦР, являющиеся интермедиатами репарации, идущей по механизму гомологичной рекомбинации в клетках, находившихся на момент облучения в фазе S клеточного цикла. По результатам проведенных исследований для оценки радиотерапевтического действия препарата РНК были выбраны временные точки 1 и 4 ч. Идея выбора состояла в том, чтобы воздействовать на клетки репаративного процесса по механизму негомологичного объединения концов в клетках, находившихся в момент облучения в фазе G1, и во время, когда возможно продолжение репарации по механизму гомологичной рекомбинации в клетках, находившихся в момент облучения в фазе S клеточного цикла (см. рис. 2, б). Установлено, что препарат РНК обладает определенным радиотерапевтическим эффектом при его введении в определенный момент времени после завершения репаративного процесса по механизму негомологичного объединения концов. Введение препарата РНК во время идущей репарации негомологичного объединения концов приводит к гибели мышей экспериментальной группы в стандартные временные параметры, показанные для контроля (11–14-е сутки после обработки радиацией).

Параллельно был проведен патоморфологический анализ селезенок контрольных и экспериментальных мышей (см. рис. 2, в). Как показали более ранние эксперименты, основное действие препарат РНК оказывает на стволовые клетки крови, которые, пережив радиацию, мигрируют в селезенку, где формируют селезеночные колонии. Предполагалось, что в селезенках мышей, входящих в группы с высокой долей выживаемости, будут обнаружены центры размножения лимфоцитов, потомков выживших и мигрировавших в селезенку стволовых клеток крови.

Патоморфологический анализ свидетельствует о следующем. В селезенках мышей контрольной группы лимфатические фолликулы достаточно многочисленны, однако резко сокращены в размерах до периферической зоны фолликулярной (центральной) артерии. У мышей, которым ввели препарат РНК за час до облучения (группа «–1 ч»), большая часть паренхимы занята сплошной

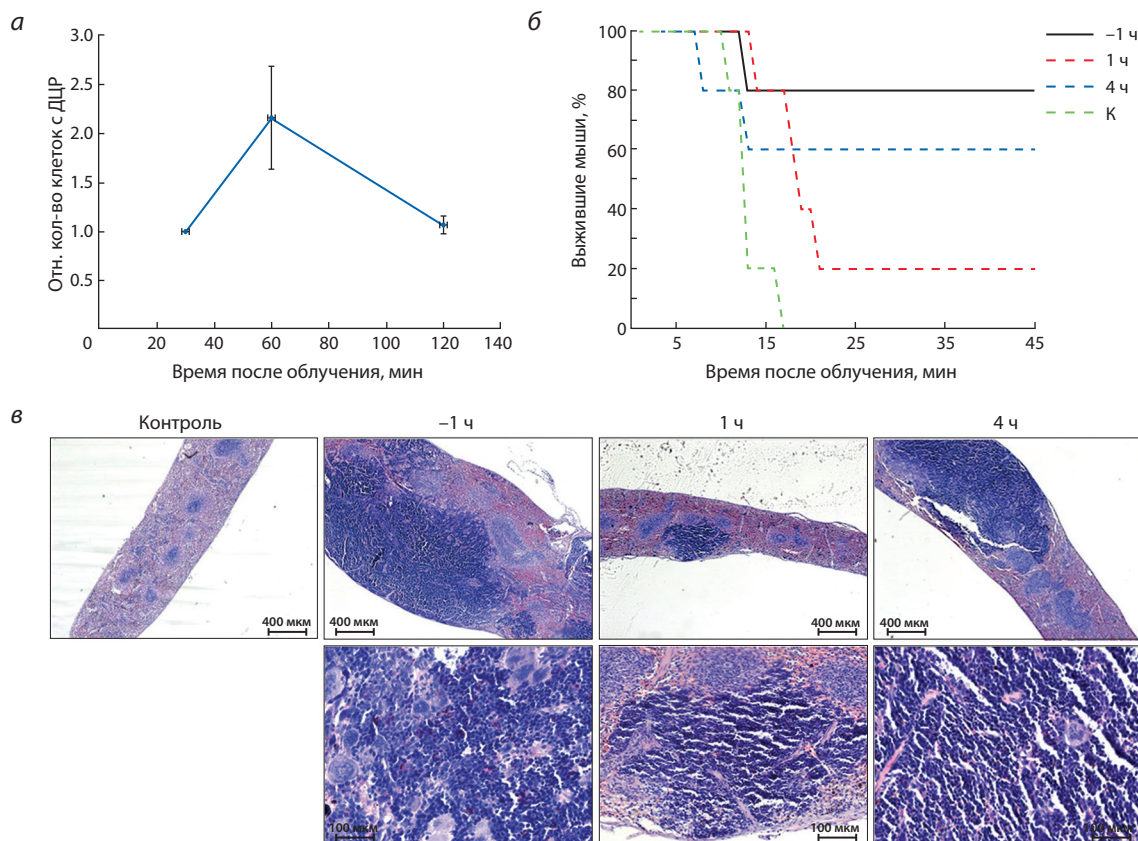


Рис. 2. Определение радиопротекторного действия препарата РНК относительно времени репарации ДЦР.

а – продолжительность цикла репарации ДЦР в клетках костного мозга мышей после воздействия летальной дозы γ -радиации 9.4 Гр. На графике приведено относительное количество клеток костного мозга мышей, в которых детектируются ДЦР; *б* – график выживаемости экспериментальных животных, обработанных препаратом РНК в критических точках репаративного процесса, установленных в результате анализа репаративного цикла ДЦР. Мышам вводили 7 мг препарата РНК за 1 ч до облучения (-1 ч), через 1 ч после облучения (1 ч) либо через 4 ч после облучения (4 ч); К – контрольная группа, мышей препаратом РНК не обрабатывали; *в* – гистологические препараты (окраска гематоксилином-эозином) селезенок мышей на 11-е сутки после облучения. Контроль – селезенка большей частью опустошена, лимфатические фолликулы достаточно многочисленны, однако резко сокращены в размерах и ограничены периферической зоной центральной артерии; -1 ч – большая часть паренхимы органа занята крупным скоплением пролиферирующих лимфоцитов; 1 ч – на фоне общего резкого уменьшения количества клеток красной и белой пульпы обнаруживается один крупный очаг лимфоцитарной пролиферации; 4 ч – по меньшей мере половину площади среза занимают крупные очаги пролиферации лимфоидных элементов.

массой пролиферирующих лимфоцитов. У группы «1 ч», которой препарат РНК ввели через час после облучения, обнаруживается один крупный очаг пролиферации лимфоцитов, занимающий менее 1/10 объема паренхимы. У группы «4 ч», получившей препарат РНК через 4 ч после облучения, по меньшей мере половину объема стромы занимают крупные очаги пролиферации лимфоидных элементов.

Полученный результат говорит об активной пролиферации клеточных элементов в паренхиме селезенок мышей, обработанных до облучения и через 4 ч после экспозиции к γ -лучам.

Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата суммарной РНК дрожжей и штатного радиопротектора Б-190

При сравнении эффективности радиозащитного действия радиопротектора Б-190 и препарата РНК в одном эксперименте (рис. 3, *а*) установлено, что препарат суммарной РНК обладает ярко выраженным радиопротекторным дей-

ствием, не уступающим по эффективности штатному препарату Б-190. Выживаемость на 40-е сутки после облучения для группы мышей, получавших препарат РНК, составила 78 %, для Б-190 – 67 % животных.

Был проведен патоморфологический анализ селезенок и трех отделов кишечника мышей, взятых из групп суммарной РНК и Б-190 (см. рис. 3, *б*). Ткани и органы забирались на 11-е сутки после проведенного облучения в абсолютной летальной дозе 9.4 Гр. Значимых патоморфологических изменений в эпителии кишечника экспериментальных мышей не обнаружено.

В селезенке мышей контрольной группы наблюдались только отдельные бластные клетки, лежащие небольшими островками среди сохранившихся клеток стромы. У животных обеих опытных групп, суммарной РНК и Б-190, в селезенке отмечено большое количество эритроидных клеток как в просвете сосудов, так и в паренхиме, при этом значительную их часть составляли молодые клетки кроветворной ткани, располагавшиеся в виде различного размера колоний. Таким образом, в опытных группах в

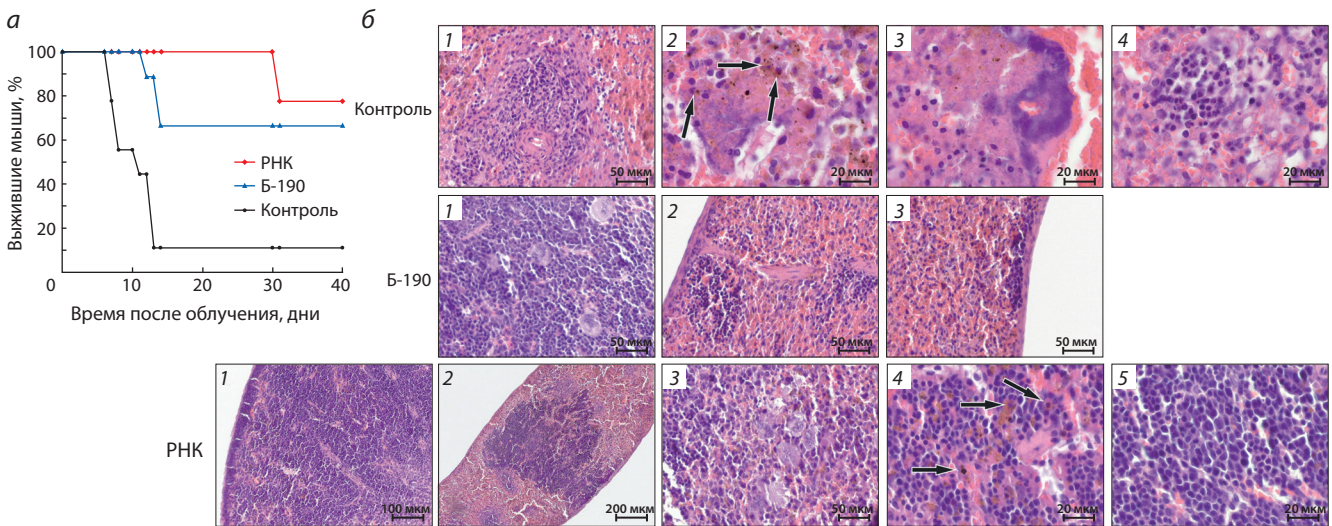


Рис. 3. Сравнение радиопротекторного действия препарата Б-190 и препарата суммарной РНК.

а – выживаемость животных после облучения дозой 9.4 Гр.

б – световая микроскопия. **Контроль:** 1 – лимфатический фолликул редуцирован до размера периартериальной зоны, 2 – множество сидерофагов (показаны стрелками) на фоне лизированных эритроцитов, 3 – скопление бактериальных клеток, 4 – островок кроветворения в красной пульпе. **Б-190:** 1 – паренхима селезенки плотно заполнена бластными элементами кроветворения, лимфоидные фолликулы отсутствуют, в большом количестве определяются мегакариоциты, 2 – субкапсулярное расположение островка кроветворения, 3 – скопление бластных кроветворных элементов под капсулой органа. **РНК:** 1 – выраженная редукция фолликулов белой пульпы, субкапсулярная концентрация бластных кроветворных клеток – плотный слой по контуру среза слева, 2 – крупное скопление бластных элементов в центральной части паренхимы, 3 – группа мегакариоцитов, 4 – многочисленные сидерофаги среди бластных элементов (стрелки), 5 – молодые клетки лимфопоэза.

селезенке наблюдалась картина экстрамедуллярного гемопоэза с образованием колоний кроветворных клеток, большинство из которых являлись предшественниками эритропоэза.

В отличие от мышей, профилактически получавших препарат Б-190, в группе животных, пролеченных препаратом суммарной РНК, отмечены выраженная пролиферация клеток лимфоцитарного ростка и отдельные клетки-предшественники или небольшие колонии клеток других ростков гемопоэза. В селезенке мышей, получавших препарат суммарной РНК, присутствовали бластные клетки-предшественники миело- и лимфопоэза, многочисленные мегакариоциты. Предшественники лимфоцитов были преобладающим типом клеток в большей части полей наблюдения при ТЭМ исследовании. Кроме того, среди мезенхимальных клеток идентифицированы мелкие группы клеток-предшественников гранулопоэза. Одновременно наблюдалась стимуляция фагоцитоза клетками стромы и увеличение васкуляризации органа.

Полученные результаты в большей мере предполагают, что два препарата обладают различными механизмами радиозащитного действия. В случае Б-190 защищаются клетки эритроидного ростка кроветворения. В случае препарата РНК и эритроидный, и лимфоидный росток кроветворения сохраняют свой функциональный потенциал.

Радиопротекторное действие двух фракций дрожжевой РНК

Аналитическое исследование препарата суммарной РНК дрожжей свидетельствовало, что в препарате присутствуют две четко разграниченные фракции, одна из которых элюируется с ГАП как одноцепочечная РНК при элюции

0.15 М PBS. Вторая фракция элюируется в условиях, характерных для двуцепочечных нуклеиновых кислот, при 0.25 М PBS. Размер элюирующихся нуклеиновых кислот находился в пределах 50–400 п. н. (рис. 4, а, б). Проведенные эксперименты по радиопротекции обеих фракций свидетельствовали, что при равных количествах радиопротекторные свойства характерны только для фракции, элюирующейся в 0.25 М PBS. При этом количество вводимого препарата, необходимое для радиопротекторного действия, многократно сокращалось. Если для достижения 80–100 % радиозащитного эффекта требуется 7–10 мг препарата РНК на мышь, то при использовании фракции, элюирующейся в 0.25 М PBS, количество препарата, равное 160 мкг на мышь, полностью защищает животное от абсолютно летальной дозы γ -облучения (см. рис. 4, в).

Одним из интригующих вопросов, касающихся фракции дрожжевой РНК, обладающей радиопротекторным действием и элюирующейся в условиях, характерных для двуцепочечных структур ДНК или РНК (0.25 М PBS), был вопрос о типе нуклеиновых кислот этой фракции. В этой связи нами проведены эксперименты по характеристике молекулярного состава данной фракции суммарной РНК дрожжей. Для исследования, как и для экспериментов по радиопротекции, фракционирование нуклеиновых кислот препарата дрожжевой РНК осуществляли методом адсорбционной хроматографии на колонке с ГАП. Определено, что в препарате суммарной РНК присутствует ~1–3 % нуклеиновых кислот в двуцепочечной форме.

Для определения типа нуклеиновых кислот фракций были выполнены различные эксперименты с использованием обработки нуклеазами (ДНКаза I, SI нуклеаза) после

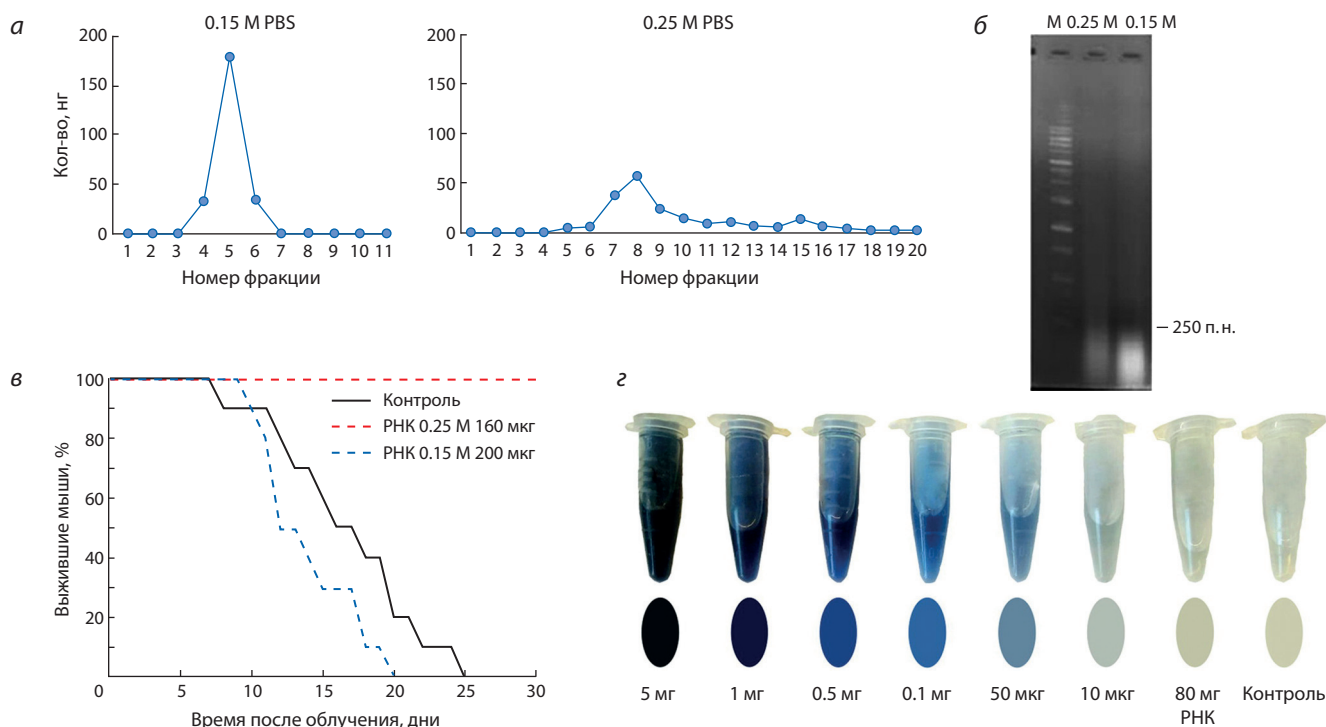


Рис. 4. Идентификация фракции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей его радиопротекторное действие.

а – хроматография суммарной РНК дрожжей на ГАП. На графиках представлены профили элюции нуклеиновых кислот в 0.15 и 0.25 М PBS; **б** – электрофоретический анализ подвижности фракций нуклеиновых кислот 0.15 и 0.25 М в 1 % агарозном геле, окраска бромистым этидием, М – маркер молекулярного веса 1 kb; **в** – радиопротекторное действие фракции препарата суммарной РНК, полученной элюцией с ГАП 0.25 М PBS. Препараты РНК вводили мышам СВА за 40 мин до облучения; **г** – оценка содержания ДНК в препарате суммарной РНК дрожжей по цветной реакции Деше. Представлены результаты цветной реакции различных количеств (10–5000 мкг) препарата ДНК в сравнении с препаратом нуклеиновых кислот, полученным после гидролиза 80 мг суммарной дрожжевой РНК. В верхней части рисунка показаны цветные изображения образцов после реакции Деше, в нижней – цветовые гаммы полученных образцов в сравнении с цветами шкалы Pantone. В качестве контроля использовали реакционный буфер.

денатурации или щелочью, или кипячением, или без таковой, которые не дали однозначно трактуемых результатов. В результате, чтобы установить принадлежность анализируемой фракции к тому или иному типу нуклеиновых кислот, был выбран метод анализа нуклеиновых кислот с использованием дифениламина и специфической цветной реакции на дезоксирибозу. Предполагалось, что если в исходной РНК присутствует ~1–3 % двуцепочечной формы нуклеиновых кислот, то при выделении из большого количества исходного препарата РНК (50–100 мг) будет получена уверенная, однозначно трактуемая цветная реакция. Исходный препарат РНК в количестве 80 мг гидролизировали 24 ч слабой щелочью. После гидролиза проводилось осаждение полимерной формы нуклеиновых кислот. Полученные результаты свидетельствуют, что фракция препарата суммарной РНК, элюирующаяся в 0.25 М фосфатном буфере, является двуцепочечной формой РНК (см. рис. 4, г), и, таким образом, можно полагать, что радиопротекторный эффект обусловлен молекулами двуцепочечной РНК.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов двуцепочечной РНК фракции 0.25 М

Для понимания происхождения РНК фракции 0.25 М было необходимо определить принадлежность составляющих двуцепочечных РНК фрагментов к генетическому локусу хромосом дрожжей. Фрагменты двуцепочечной

РНК фракции, элюирующейся 0.25 М PBS, клонировали и секвенировали. Последовательности были объединены в группы гомологий (рис. 5). Анализ последовательностей секвенированных клонов свидетельствует, что в популяции выделяемых молекул присутствуют различные типы РНК, относящиеся к РНК рибосомального кластера или к транскриптам, кодирующим белки, ассоциированные с рибосомами. Приведенные данные предполагают, что для радиозащитного действия нуклеотидные последовательности фрагментов РНК не имеют значения.

С помощью программы <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> была проанализирована возможность секвенированных РНК образовывать шпилечные структуры. Для этого были выбраны наиболее протяженные последовательности из каждой группы гомологий. В результате обнаружено, что все проанализированные последовательности могут формировать шпилечные структуры. Для многих вариантов энергия образования шпилек (энергия Гиббса) имеет высокое значение, что предполагает преимущественное формирование таких структур (данные не приводятся).

Обсуждение

В нашей ранней работе (Likhacheva et al., 2007) было показано, что фрагментированная ДНК (препарат «Панаген», ЛСР № 004429/08 от 09.06.2008, ДНК мыши), введенная в организм смертельно облученных мышей, обладает вы-

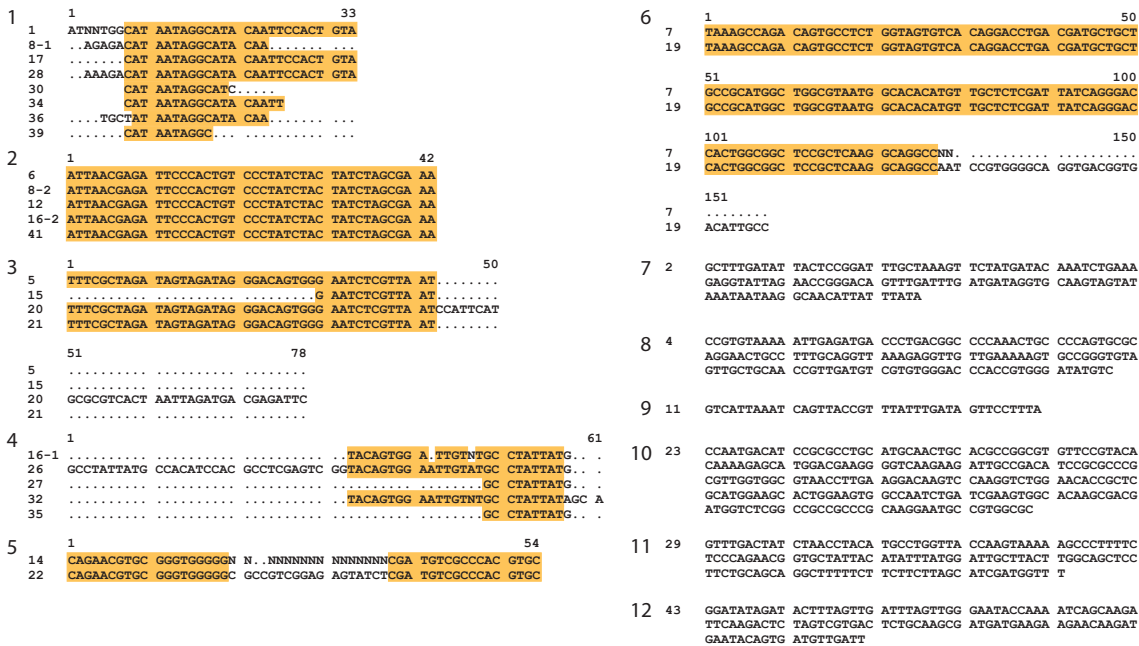


Рис. 5. Определение структуры двуцепочечной РНК. Группы гомологий и видовая принадлежность секвенированных последовательностей: 1, 4–8, 10, 12 – видовая принадлежность не определена; 2, 3 – фрагмент гена 25S рибосомальной РНК *S. cerevisiae*; 9 – фрагмент гена 18S рибосомальной РНК *S. cerevisiae*; 11 – фрагмент гена TMA22 (YJR014W) *S. cerevisiae*, кодирующего белок, ассоциированный с рибосомой.

раженным радиопротекторным действием – при ЛД100/30 выживаемость животных составляет 70–90 %. При этом радиопротекторный эффект фрагментов двуцепочечной ДНК коррелирует с развитием селезеночных колоний. Кроме того, при внутривенном введении экстраклеточная двуцепочечная ДНК доставляется в клетки костного мозга, в том числе в CD34+ стволовые гемопоэтические клетки мыши, где может депонироваться и обнаруживается в течение 14 дней после введения (Dolgoва et al., 2013a, b). Именно эти два факта легли в основу предположения, что фрагменты двуцепочечной ДНК спасают стволовые гемопоэтические клетки, которые мигрируют на периферию, стабилизируются в селезенке и дают начало новой кроветворной и иммунной системам мышинного организма, разрушенной высокодозовой γ -радиацией.

Поскольку было показано, что двуцепочечная форма нуклеиновых кислот (ДНК) отвечает за радиопротекторный эффект, детектируемый в проведенных экспериментах, нами сделано предположение, что за радиопротекторный эффект препарата суммарной РНК *S. cerevisiae* отвечает присутствующая в нем двуцепочечная фракция нуклеиновых кислот.

Хроматографией на гидроксипатите была выделена фракция препарата РНК, элюирующаяся с колонки как двуцепочечная форма нуклеиновых кислот. Биологические тесты на радиопротекторные свойства этой фракции однозначно свидетельствовали, что за радиопротекторный эффект препаратов РНК дрожжей отвечает двуцепочечная форма нуклеиновых кислот, составляющая ~1–3 % от суммарной РНК препарата, находящегося в работе. При этом эффективная доза ЛД100/30 для суммарного препарата составляла 7–10 мг/мышь, в то время как для двуцепочечной формы – 160 мкг/мышь, что в ~60 раз меньше. В много-

кратных экспериментах показано, что введение препарата двуцепочечной нуклеиновой кислоты за 60–30 мин до облучения полностью купирует радиационное действие γ -потока. Выживает 80–100 % экспериментальных мышей.

С использованием метода дифференцированного гидролиза щелочью и кислотой и специфического качественного окрашивания на присутствие ДНК было установлено, что двуцепочечная форма, выделяемая в составе препаратов РНК и обладающая радиопротекторными свойствами, представляет собой двуцепочечную РНК. Фрагменты двуцепочечной РНК, переведенные в форму кДНК, были клонированы и секвенированы. Определено, что смесь фрагментов двуцепочечной РНК гетерогенна по первичной структуре и, по-видимому, для осуществления радиопротекторного действия не требуется специфической последовательности.

При анализе радиозащитного действия двуцепочечной РНК установлено, что так же, как и в случае с препаратами двуцепочечной ДНК, в селезенках экспериментальных животных формируются селезеночные колонии. Колонии состоят из пролиферирующих клеточных элементов, которые, как предполагается, представляют собой потомков, спасенных стволовых гемопоэтических предшественников, дающих начало новой кроветворной и иммунной системе, которые были разрушены облучением.

Введение препарата в точку максимально активной репарации ДЦР, идущей по механизму негомологического объединения концов, через 1 ч после получения полной летальной дозы 9.4 Гр (см. рис. 2, б) не защищает мышей от гибели от облучения. При этом инъекции препарата через 4 ч после облучения, т. е. тогда, когда активная фаза процесса репарации негомологического объединения концов завершена, эффективно (до 60 %) спасают мышей от

гибели. У таких животных полностью восстанавливаются кроветворные ростки костного мозга и детектируется вырванное колониобразование в селезенках.

Предполагается, что фрагменты двуцепочечной РНК, доставленные в клетку в момент идущего репаративного процесса, интерферируют процесс репарации негомологичного объединения концов, причем эта интерференция может быть обусловлена различными механизмами (конкуренция связывания репаративных комплексов, индукция конфликтного репаративного процесса иной природы, блокада квазиматрицей субстратных двуцепочечных концов).

Облучение с указанной дозой 9.4 Гр и мощностью 0.74–1.4 Гр/мин является острым облучением, для которого появление и накопление ДЦР, оцененное методом фокусов к гистону γ H2X, происходит к 40–60-й минуте после окончания облучения (Peitzsch et al., 2013; Озеров, Осипов, 2015). Такой результат близок к данным, полученным в настоящем исследовании.

Известно, что при остром облучении помимо простых ДЦР формируются «сложные», образующиеся в результате индукции других повреждений хроматина и активации иных репаративных процессов (Озеров, Осипов, 2015). Авторы цитируемой работы сообщают, что до 20 % ДЦР при γ -облучении относятся к «сложным повреждениям» и репарируются значительно позже, чем ДЦР, индуцированные непосредственным разрывом хроматина. Возможно, обнаруженный терапевтический эффект связан с репарацией хроматина в стволовых клетках костного мозга по типу гомологичной рекомбинации с участием внешней РНК матрицы. Этот тип репарации активируется значительно позже по сравнению с аварийным негомологичным объединением концов. Тот факт, что на графиках, полученных при оценке числа ДЦР, показатели в последней анализируемой точке (2 ч) ни в одном из приведенных экспериментов не опускались до значения исходной нулевой отметки, согласуется с высказанным выше предположением.

В литературе известны варианты репаративных процессов с использованием РНК и ДНК матрицы. Для РНК описаны модели, в которых основным лейтмотивом является построение кДНК копии и вовлечение двуцепочечной формы этой нуклеиновой кислоты в репаративный процесс (Storici et al., 2007; Meers et al., 2016). Для двуцепочечной ДНК также известны различные модели репарации с привлечением внешней двуцепочечной матрицы (Leung et al., 1997; Bärtsch et al., 2000; Li et al., 2001; Symington, 2005). Характерным для участия таких нуклеиновых кислот в идущем репаративном процессе является внедрение процессированного 3'ОН конца разорванного хроматина между цепей внешней матрицы и формирование интермедиата репарации. Далее могут осуществляться различные описанные варианты достраивания цепей и восстановления целостности хроматина. Можно предположить, что репарация в присутствии экстраклеточных двуцепочечных РНК идет именно по такому общему молекулярному сценарию. О важной роли двуцепочечной формы нуклеиновых кислот при осуществлении репаративного процесса свидетельствуют данные, полученные в работе (Storici et al., 2007), где показано, что дуплекс РНК/ДНК повышает

эффективность репарации по сравнению с одноцепочечной РНК на два-три порядка.

Полное отсутствие радиозащитного действия у препарата одноцепочечной РНК в дозах, сопоставимых с радиопротекторными дозами двуцепочечной РНК, предполагает, что радиопротекторное действие двуцепочечной РНК связано с появившейся в клеточном прострэнстве стволовых гемопоэтических клеток внехромосомной двуцепочечной матрицы. Внедрение между цепями такой двуцепочечной РНК матрицы процессированного филамента ДНК ДЦР может быть главным событием, определяющим дальнейшие фазы репарации фатального повреждения, индуцированного γ -радиацией.

Заклучение

Таким образом, данные молекулярно-биологических исследований, экспериментов с использованием клеточных технологий и биологические тесты свидетельствуют, что субстанцией, определяющей радиопротекторное действие фракции «0.25 М» РНК дрожжей *S. cerevisiae*, является двуцепочечная форма молекул РНК.

Список литературы / References

- Озеров И.В., Осипов А.Н. Кинетическая модель репарации двуни-
тевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при
действии редкоионизирующего излучения с различной мощ-
ностью дозы. *Компьютерные исследования и моделирование*.
2015;7(1):159-176. DOI 10.20537/2076-7633-2015-7-1-159-176.
[Ozerov I.V., Osipov A.N. Kinetic model of DNA double-strand
break repair in primary human fibroblasts exposed to low-LET irra-
diation with various dose rates. *Kompyuternye Issledovaniya i Mo-
delirovanie = Computer Research and Modeling*. 2015;7(1):159-
176. DOI 10.20537/2076-7633-2015-7-1-159-176. (in Russian)]
- Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Кисаретова П.Э., Долго-
ва Е.В., Проскурина А.С., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Бай-
бородин С.И., Таранов О.С., Ефремов Я.Р., Колчанов Н.А.,
Богачев С.С. Изучение радиопротекторного действия двуцепо-
чечной РНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
В: Четвертый междисциплинарный науч. форум с междунар. участием
«Новые материалы и перспективные технологии»: Сб. материа-
лов. М., 2018;II:161-167.
[Ritter G.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Kisaretova P.E., Dol-
gova E.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Kirikovich S.S., Bay-
borodin S.I., Taranov O.S., Efremov Y.R., Kolchanov N.A., Bo-
gachev S.S. Study of radioprotective action of double-stranded RNA
extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. In: The Fourth interdis-
ciplinary scientific forum with international participation "New Mate-
rials and Promising Technologies": Proceedings. Moscow, 2018;II:
161-167. (in Russian)]
- Bärtsch S., Kang L.E., Symington L.S. *RAD51* is required for the repair
of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chro-
mosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(4):1194-1205. DOI
10.1128/mcb.20.4.1194-1205.2000.
- Belli M., Sapora O., Tabocchini M.A. Molecular targets in cellular re-
sponse to ionizing radiation and implications in space radiation pro-
tection. *J. Radiat. Res.* 2002;43(S):S13-S19. DOI 10.1269/jrr.43.s13.
- Bergonié J., Tribondeau L. Interpretation of some results from radio-
therapy and an attempt to determine a rational treatment technique
(1906). *Yale J. Biol. Med.* 2003;76(4):181-182.
- Dent P., Yacoub A., Contessa J., Caron R., Amorino G., Valerie K.,
Hagan M.P., Grant S., Schmidt-Ullrich R. Stress and radiation-induced
activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat. Res.*
2003;159(3):283-300. DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0283:
sariao]2.0.co;2.

- Dische Z. In: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.). *Methods in Enzymology*. Vol. III. New York: Acad. Press, 1957.
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene*. 2013a;528(2):74-83. DOI 10.1016/j.gene.2013.06.058.
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Bogachev S.S., Gvozdeva T.S., Malkova E.M., Taranov O.S., Rogachev V.A., Panov A.S., Zagrebnyi S.N., Shurdov M.A. Pathological changes in mice treated with cyclophosphamide and exogenous DNA. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2013b;3(4):291-304. DOI 10.1134/S2079059713040035.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64(1):97-112. DOI 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 1994;65(1):7-17. DOI 10.1080/09553009414550021.
- Leung W., Malkova A., Haber J.E. Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94(13):6851-6856. DOI 10.1073/pnas.94.13.6851.
- Li J., Read L.R., Baker M.D. The mechanism of mammalian gene replacement is consistent with the formation of long regions of heteroduplex DNA associated with two crossing-over events. *Mol. Cell Biol.* 2001;21(2):501-510. DOI 10.1128/mcb.21.2.501-510.2001.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Rogachev V.A., Prokhorovich M.A., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose γ -radiation. *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007;11(2):305-314.
- Maréchal A., Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(9). DOI 10.1101/cshperspect.a012716.
- Meers C., Keskin H., Storic F. DNA repair by RNA: templated, or not templated, that is the question. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:17-21. DOI 10.1016/j.dnarep.2016.05.002.
- Morgan W.F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. *Radiat. Res.* 2003a;159(5):567-580. DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0567:nadeoe]2.0.co;2.
- Morgan W.F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vivo*, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.* 2003b;159(5):581-596. DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0581:nadeoe]2.0.co;2.
- Patt H.M., Tyree E.B., Straube R.L., Smith D.E. Cysteine protection against X irradiation. *Science*. 1949;110(2852):213-214. DOI 10.1126/science.110.2852.213.
- Peitzsch C., Kurth I., Kunz-Schughart L., Baumann M., Dubrovska A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother. Oncol.* 2013;108(3):378-387. DOI 10.1016/j.radonc.2013.06.003.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J. Cell Biol.* 1999;146(5):905-915. DOI 10.1083/jcb.146.5.905.
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 1998;273(10):5858-5868. DOI 10.1074/jbc.273.10.5858.
- Shemetun O.V., Pilinska M.A. Radiation-induced bystander effect – modeling, manifestation, mechanisms, persistence, cancer risks. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019;24:65-92. DOI 10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
- Storic F., Bebenek K., Kunkel T.A., Gordenin D.A., Resnick M.A. RNA-templated DNA repair. *Nature*. 2007;447(7142):338-341. DOI 10.1038/nature05720.
- Symington L.S. Focus on recombinational DNA repair. *EMBO Rep.* 2005;6(6):512-517. DOI 10.1038/sj.embor.7400438.
- Vogin G., Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2013;89(1):2-8. DOI 10.3109/09553002.2012.717732.
- Wang Y., Xu C., Du L.Q., Cao J., Liu J.X., Su X., Zhao H., Fan F.Y., Wang B., Katsube T., Fan S.J., Liu Q. Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(11):22449-22461. DOI 10.3390/ijms141122449.
- Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1988;35(C):95-125. DOI 10.1016/S0079-6603(08)60611-X.

ORCID ID

G.S. Ritter orcid.org/0000-0003-1573-3795
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331
O.S. Taranov orcid.org/0000-0002-6746-8092
T.D. Dubatolova orcid.org/0000-0003-2807-774X
E.V. Dolgova orcid.org/0000-0002-5543-248X
E.A. Potter orcid.org/0000-0003-1558-8655

S.S. Kirikovich orcid.org/0000-0002-3426-4501
Ya.R. Efremov orcid.org/0000-0002-0649-7543
M.V. Romanenko orcid.org/0000-0003-2184-8919
M.I. Meschaninova orcid.org/0000-0003-0045-2413
A.G. Venyaminova orcid.org/0000-0002-7858-6932
N.A. Kolchanov orcid.org/0000-0001-6800-8787
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382

Благодарности. Работа поддержана бюджетным финансированием Института цитологии и генетики СО РАН по теме государственного задания № 0324-2019-0042-С-01 (номер госрегистрации АААА-А17-117071240065-4) и грантом РФФИ № 18-34-00205. Работы по микроскопии клеток выполнены при поддержке бюджетного финансирования Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН по теме государственного задания № 0310-2019-0005.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.02.2020. После доработки 16.07.2020. Принята к публикации 16.07.2020.

CpG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro*

А.А. Останин¹✉, О.Ю. Леплина¹, Е.А. Буракова^{2,3}, Т.В. Тыринова^{1,2}, А.А. Фокина^{2,3}, А.С. Проскурина³, С.С. Богачев³, Д.А. Стеценко^{2,3}, Е.Р. Черных¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Аннотация. Миелоидные дендритные клетки (ДК) играют важную роль в иммунном ответе, поэтому актуальной задачей является поиск соединений, способных эффективно активировать ДК. Целью настоящей работы было изучение влияния синтетических CpG олигодезоксинуклеотидов (CpG-ODN) на созревание и аллостимуляторную активность миелоидных ДК в сравнении с другими PAMP и DAMP молекулами. Для исследований были синтезированы CpG-ODN класса C (SD-101 и D-SL03), содержащие тиофосфатные межнуклеотидные группы, а также получены их оригинальные фосфат-модифицированные аналоги (SD-101M и D-SL03M) с мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами (M = μ -модификация). Эффекты CpG-ODN и других активаторов оценивали в культурах ДК, генерированных из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN- α (IFN-ДК) или IL-4 (IL4-ДК). Оценка внутриклеточной экспрессии TLR-9 показала, что оба типа ДК (IFN-ДК и IL4-ДК) содержали в среднем 52 и 80 % TLR-9-позитивных клеток соответственно. Исследуемые CpG-ODN усиливали аллостимуляторную активность IFN-ДК, причем эффект μ -модифицированных CpG-ODN был выше, чем тиофосфатных CpG-ODN. Стимулирующий эффект CpG-ODN в дозе 1.0 мкг/мл был сопоставим (для D-SL03, D-SL03M, SD-101) или превышал (для SD-101M) действие липополисахарида (LPS) в дозе 10 мкг/мл. При этом IFN-ДК характеризовались большей чувствительностью к действию CpG-ODN, чем IL4-ДК. Усиление аллостимуляторной активности ДК в присутствии CpG-ODN было связано с индукцией конечного созревания клеток, что подтверждалось значимым снижением количества CD14⁺ ДК, увеличением доли зрелых CD83⁺ ДК и тенденцией к возрастанию CD86⁺ ДК. Интересно, что характерная для LPS способность усиливать экспрессию костимуляторной молекулы OX40L на ДК была выявлена только для μ -аналога SD-101M. Кроме того, CpG-ODN (SD-101 и SD-101M) оказывали стимулирующий эффект на продукцию IFN- γ , сопоставимый с действием LPS. Полученные в целом данные свидетельствуют о стимулирующем действии CpG-ODN на созревание и аллостимуляторную активность миелоидных ДК человека, которое более выражено для μ -модифицированных аналогов.

Ключевые слова: моноциты; дендритные клетки; дифференцировка; созревание; PAMP- и DAMP-активаторы; алло-СКЛ; CpG-олигонуклеотид.

Для цитирования: Останин А.А., Леплина О.Ю., Буракова Е.А., Тыринова Т.В., Фокина А.А., Проскурина А.С., Богачев С.С., Стеценко Д.А., Черных Е.Р. CpG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):653-660. DOI 10.18699/VJ20.659

Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells

А.А. Останин¹✉, О.Ю. Леплина¹, Е.А. Буракова^{2,3}, Т.В. Тыринова^{1,2}, А.А. Фокина^{2,3}, А.С. Проскурина³, С.С. Богачев³, Д.А. Стеценко^{2,3}, Е.Р. Черных¹

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Abstract. Myeloid dendritic cells (DCs) play an important role in the immune response; therefore, the search for compounds that can effectively activate DCs is a needful goal. This study was aimed to investigate the effect of synthetic CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on the maturation and allostimulatory activity of myeloid DCs in comparison with other PAMP and DAMP molecules. For the research, we synthesized known CpG-ODN class C (SD-101 and D-SL03) containing thiophosphate internucleotide groups, and their original phosphate-modified analogues (SD-101M and D-SL03M) with mesylphosphoramidate internucleotide groups (M = μ -modification). The effects of CpG-ODN and other

activators were evaluated on DCs generated from blood monocytes in the presence of GM-CSF and IFN- α (IFN-DC) or IL-4 (IL4-DC). Evaluation of the intracellular TLR-9 expression showed that both types of DCs (IFN-DC and IL4-DC) contained on average 52 and 80 % of TLR-9-positive cells, respectively. The CpG-ODNs studied enhanced the allostimulatory activity of IFN-DCs, and the effect of μ -modified CpG-ODNs was higher than that of CpG-ODNs with thiophosphate groups. The stimulating effect of CpG-ODN at a dose of 1.0 μ g/ml was comparable (for D-SL03, D-SL03M, SD-101) with or exceeded (for SD-101M) the effect of LPS at a dose of 10 μ g/ml. At the same time, IFN-DCs were characterized by greater sensitivity to the action of CpG-ODNs than IL4-DCs. The enhancement of DC allostimulatory activity in the presence of CpG-ODNs was associated with the induction of final DC maturation, which was confirmed by a significant decrease in the number of CD14⁺DC, an increase in mature CD83⁺DC and a trend towards an increase in CD86⁺DC. Interestingly, the characteristic ability of LPS to enhance the expression of the co-stimulatory molecule OX40L on DCs was revealed only for the μ -analogue SD-101M. In addition, CpG-ODNs (SD-101 and SD-101M) had a stimulatory effect on IFN- γ production comparable to the action of LPS. The data obtained indicate a stimulating effect of CpG-ODN on the maturation and allostimulatory activity of human myeloid DCs, which is more pronounced for μ -modified analogs. Key words: monocytes; dendritic cells; differentiation; maturation; PAMP- and DAMP-activators; allo-MLR; CpG-oligonucleotide.

For citation: Ostanin A.A., Leplina O.Y., Burakova E.A., Tyrinova T.V., Fokina A.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S., Stetsenko D.A., Chernykh E.R. Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):653-660. DOI 10.18699/VJ20.659

Введение

Дендритные клетки (ДК) играют важную роль в иммунном ответе, что позволяет рассматривать их в качестве мишени и перспективного клеточного продукта при разработке новых методов иммунотерапии рака. Поскольку иммуностимулирующая активность характерна только для зрелых ДК с высокой экспрессией антигенпрезентирующих и костимуляторных молекул (Banchereau et al., 2000), то, несомненно, актуальным направлением исследований представляется поиск соединений, способных эффективно активировать ДК и индуцировать их созревание.

Природными активаторами ДК являются консервативные молекулы патогенов класса PAMP (pathogen-associated molecular patterns) и высвобождающиеся при повреждении собственных клеток молекулы класса DAMP (damage-associated molecular patterns). Эффекты первых опосредуются через паттерн-распознающие рецепторы. Молекулы класса DAMP распознаются внутриклеточными сенсорами и активируют ДК через вторичные мессенджеры, например фактор некроза опухоли-альфа (Jounai et al., 2013; Kawasaki, Kawai, 2014). Действие различных соединений на ДК человека оценивается обычно в культурах ДК моноцитарного происхождения, генерированных *in vitro* в присутствии цитокинов GM-CSF/IL4 или GM-CSF/IFN- α (Cehim, Chies, 2019). При этом в качестве одного из стандартных активаторов используют липополисахарид (LPS), являющийся лигандом TLR-4. Однако в силу пирогенности LPS не может использоваться в клинических исследованиях.

Бактериальная и вирусная ДНК также способны активировать конечное созревание ДК. Эта активность связана с наличием в их структуре неметилированных CpG динуклеотидов и может имитироваться синтетическими CpG олигодезоксинуклеотидами (CpG-ODN), опосредующими сигналинг через TLR-9 (Половинкина, Марков, 2010). Синтетические CpG-ODN продемонстрировали выраженный иммуностимулирующий и противоопухолевый эффект *in vivo* и рассматриваются в настоящее время в качестве перспективных адьювантов в иммунотерапии рака (Scheiermann, Klinman, 2014; Shiota, Klinman, 2014; Shiota et al., 2015). В экспериментальных исследованиях

на мышах показано, что наряду с плазмацитоидными ДК CpG-ODN оказывают стимулирующий эффект и на костномозговые ДК (Behboudi et al., 2000). В то же время у человека чувствительность к CpG-ODN связывают преимущественно с плазмацитоидными ДК, а данные об эффектах CpG-ODN на миелоидные ДК представлены единичными исследованиями, результаты которых противоречивы (Behboudi et al., 2000; Hoene et al., 2006).

Целью настоящей работы было изучение влияния CpG-ODN на созревание и аллостимуляторную активность миелоидных ДК, генерированных из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN- α (IFN-ДК) или IL-4 (IL4-ДК), в сравнении с другими PAMP- (LPS) и DAMP-активаторами. Планировалось проанализировать эффекты CpG-ODN класса C: SD-101 (Levy et al., 2016) и D-SL03 (Yang et al., 2013), содержащих тиофосфатные межнуклеотидные группы, а также оригинальных фосфат-модифицированных аналогов (SD-101M, D-SL03M) с мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами (μ -модификация) (Челобанов и др., 2017).

Для сравнения в качестве активаторов класса DAMP планировалось оценить эффект двуцепочечной ДНК человека (дцДНК), а также синтетического поликатионного адьюванта азоксимер бромида (Kabanov, 2004; Powell et al., 2015), способного усиливать антиген-презентирующую функцию ДК через активацию провоспалительных сигнальных путей (Dyakonova et al., 2004).

Материалы и методы

Для исследования нами были синтезированы, очищены и охарактеризованы CpG-ODN класса C: SD-101 и D-SL03, содержащие тиофосфатные межнуклеотидные группы, а также оригинальные модифицированные аналоги (SD-101M, D-SL03M) с мезилфосфорамидными (μ) межнуклеотидными связями. Последовательности полученных CpG-ODN приведены в табл. 1.

Для получения ДК из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров выделяли мононуклеарные клетки (МНК) центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина. IFN-ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК во флаконах

Таблица 1. CpG-олигонуклеотиды (CpG-ODN), использованные в работе

Обозначение	Последовательность (5'-3')	Длина, нт	Межнуклеотидная группа	CpG (есть/нет)
SD-101	tcgaacggttcgaacggttcgaac:gttcgaat	30	PS	CpG
SD-101M	tcgaacggttcgaacggttcgaac:gttcgaat	30	μ	CpG
D-SL03	tcgcgaacggttcgcccgttc:gaacgagg	29	PS	CpG
D-SL03M	tcgcgaacggttcgcccgttc:gaacgagg	29	μ	CpG
ODNcontrol	tgcaagcttgcaagcttgcaag:cttgcaat	30	μ	Контроль без CpG

Примечание. CpG динуклеотиды выделены жирным шрифтом; палиндромная последовательность подчеркнута; середина палиндрома обозначена двоеточием. PS – тиофосфатная группа; μ – мезилфосфорамидная группа.

Falcon (BD Biosciences, Великобритания) в течение 3 сут в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0.3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5 % сыворотки плодов коровы («БиолоТ», Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и IFN-альфа (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим созреванием с липополисахаридом (LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 48 ч.

Для генерации ИЛ4-ДК прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF, ИЛ-4 (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и 5 % сыворотки плодов коровы на протяжении 5 сут с последующим созреванием с LPS в течение 48 ч. Для индукции конечного созревания ДК употребляли также другие активаторы: азоксимер бромид (АБ, «Петровакс») в дозе 2 нг/мл, двуцепочечную ДНК (дцДНК) в дозе 5 мкг/мл, а также исследуемые соединения CpG-ODN в различных концентрациях.

Внутриклеточную экспрессию TLR-9 среди незрелых ДК (ДК₀) оценивали в популяциях IFN-ДК и ИЛ4-ДК на 3-и и 5-е сутки генерации соответственно. Для этого проводили процедуру пермеабилзации клеток, применяя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабилзации (BD Cytotfix/ Cytoperm™, США) согласно методике производителя и APC-меченные анти-TLR-9 антитела (BD PharMingen, США). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичным флуорохромом. Процентное содержание ДК, экспрессирующих TLR-9, рассчитывали на 10000 клеток.

Стимуляторную активность ДК оценивали в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ), используя в качестве отвечающих клеток МНК доноров, которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах (0.1 × 10⁶/луночку) в среде RPMI-1640 с 10 % инактивированной сыворотки доноров группы АВ (IV) при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили ДК в соотношении МНК : ДК = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивали на 5-е сутки радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКиори/луночку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Иммунофенотип генерированных IFN-ДК определяли методом проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител, меченных фикоэритрином (PE) анти-CD14 («Сорбент», Москва) и анти-OX40L (анти-CD252, BioLegend, США), меченных FITC анти-CD83, анти-CD86 (BD PharMingen, США) и анти-HLA-DR («Сорбент», Москва).

Содержание цитокинов (TNF-α, IFN-γ) в 5-суточных супернатантах генерированных IFN-ДК оценивали методом ИФА с помощью тест-систем согласно инструкции фирмы производителя («Вектор-Бест», Новосибирск).

Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR; LQ-UQ). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона (для связанных выборок). Выявленные различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

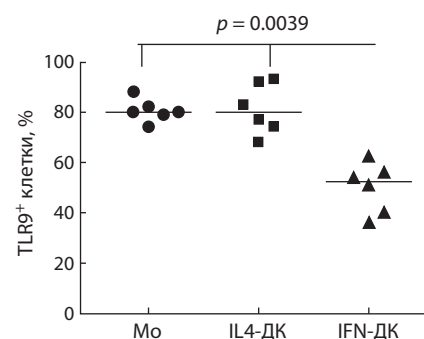


Рис. 1. Внутриклеточная экспрессия TLR-9 моноцитами и незрелыми ИЛ4-ДК и IFN-ДК здоровых доноров (n = 6).

Данные представлены в виде индивидуальных и медианных значений; p – U-критерий Манна-Уитни.

Результаты

Оценка внутриклеточной экспрессии TLR-9 среди свежeweделенных моноцитов крови здоровых доноров, а также «незрелых» IFN-ДК и ИЛ4-ДК, генерированных соответственно в течение 3 и 5 сут, показала, что доля TLR-9-позитивных клеток среди моноцитов-предшественников и ИЛ4-ДК составляет в среднем 80 % (рис. 1). Содержание TLR-9⁺ клеток в популяции IFN-ДК было значимо ниже, варьируя в диапазоне от 40 до 56 % (Me 52.5 %, $p < 0.05$). Тем не менее полученные данные свидетельствуют о потенциальной чувствительности ДК, генерированных с помощью как ИЛ-4, так и IFN-альфа, к стимулирующему действию CpG-ODN в качестве созревающих сигналов.

Поэтому на следующем этапе провели скрининг полученных нами CpG олигонуклеотидов в диапазоне доз от 0.5 до 5.0 мкг/мл по их влиянию на способность IFN-ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ (табл. 2). Аллостимулятор-

Таблица 2. Т-клеточный пролиферативный ответ в алло-СКЛ (срм) и аллостимуляторная активность (FI) IFN-ДК, генерированных с различными CpG-ODN

Варианты алло-СКЛ	Контроль	CpG-ODN			
		0.5 мкг/мл	1.0 мкг/мл	2.5 мкг/мл	5.0 мкг/мл
МНК + ДК ₀	срм	2310 (1630–2600)			
МНК + ДК _{ODNконтроль}	срм	2350 (2100–2500)			
	FI	1.03 (0.99–1.39)			
МНК + ДК _{LPS}	срм	7730 (5630–9620)			
	FI	2.9 (2.5–4.6)			
МНК + ДК _{SD-101}	срм	5520 (4650–11 890)	6550 (3510–9650)	7520 (4950–10 380)	6960 (5830–10 130)
	FI	3.0 (2.4–5.0)	3.1 (1.8–4.6)	3.6 (3.1–4.9)	3.0 (2.6–4.8)
МНК + ДК _{SD-101M}	срм	7680 (6450–14 170)	9030 (8010–12 100)	7520 (6030–13 710)	6530 (6030–13 700)
	FI	4.6 (3.0–6.7)**	5.0 (3.7–6.0)**	4.5 (2.8–6.5)*	4.2 (2.7–6.1)
МНК + ДК _{D-SL03}	срм	3060 (2290–10 080)	4660 (3550–12 960)	4260 (3200–11 140)	5180 (3210–11 460)
	FI	1.6 (1.2–4.8)	2.4 (1.5–5.3)	2.4 (1.5–5.3)	2.5 (2.0–4.8)
МНК + ДК _{D-SL03M}	срм	5930 (3380–11 420)	7210 (5080–16 060)	6670 (4700–17 100)	6000 (3760–14 150)
	FI	2.5 (1.6–5.4)**	4.0 (2.1–6.7)**	3.7 (2.0–7.7)**	2.7 (2.1–6.1)

Примечание. Данные двух независимых экспериментов ($n = 8$) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках); срм (count per minute) – импульсы в минуту; FI – индексы влияния. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – значимость различий μ -CpG-ODN по сравнению с PS-CpG-ODN в соответствующих дозах (W-критерий Вилкоксона).

Таблица 3. Т-клеточный пролиферативный ответ в алло-СКЛ (срм) и аллостимуляторная активность (FI) IFN-ДК и IL4-ДК, генерированных с различными активаторами

Варианты алло-СКЛ		IFN-ДК	IL4-ДК
МНК + ДК ₀	срм	2250 (1900–2600)	2720 (2180–3080)
МНК + ДК _{дцДНК}	срм	5710 (4810–8510)	6070 (4950–7100)
	FI	2.6 (2.3–3.1)	2.4 (2.0–2.5)
МНК + ДК _{АБ}	срм	7350 (6040–8160)	4410 (3880–5410)
	FI	2.8 (2.4–3.7)	1.7 (1.5–2.0)
МНК + ДК _{SD-101M}	срм	7900 (6090–9510)	7200 (5460–8470)
	FI	3.3 (2.9–5.0)	2.6 (2.5–2.8)
МНК + ДК _{D-SL03M}	срм	7050 (5590–10 560)	5540 (4420–7650)
	FI	3.2 (2.6–4.6)	2.0 (1.8–2.7)

Примечание. Данные двух независимых экспериментов ($n = 8$) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках); срм – импульсы в минуту; FI – индексы влияния. Активаторы: дцДНК 5 мкг/мл; АБ 2 нг/мл; SD-101M и D-SL03M 1 мкг/мл.

ная активность ДК служит интегральным показателем, поскольку ассоциирована со степенью зрелости ДК, экспрессией HLA-антигенов и костимуляторных молекул, а также со спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов. В качестве позитивного контроля использовали «классический» РАМР-активатор LPS в дозе 10 мкг/мл, в качестве негативного – ODN с μ -модификациями, но не содержащий CpG динуклеотидов, в дозе 1 мкг/мл. LPS практически трехкратно усиливал аллостимуляторную активность ДК (см. табл. 2). Контрольный ODN, не содержащий CpG, не оказывал стимулирующего влияния на функциональную активность ДК в алло-СКЛ (FI = 1.03;

IQR 0.99–1.39), тогда как все тестируемые CpG-ODN индуцировали созревание IFN-ДК, что проявлялось статистически значимым усилением аллостимуляторной активности ДК.

Характерно, что CpG-ODN с мезилфосфорамидными (μ) группами (SD-101M и D-SL03M) в дозах 0.5, 1.0 и 2.5 мкг/мл более эффективно ($p < 0.01$) индуцировали конечное созревание IFN-ДК по сравнению с аналогичными CpG-ODN с тиофосфатными группами. При этом SD-101M обладал наиболее выраженным эффектом. Так, SD-101M в минимальной тестируемой дозе (0.5 мкг/мл) проявлял дозревающий эффект, сопоставимый по своей

Таблица 4. Иммунофенотип IFN-ДК, генерированных с различными активаторами

Варианты IFN-ДК	CD14 ⁺ , %	CD83 ⁺ , %	CD86 ⁺ , %	HLA-DR ⁺ , %	HLA-DR ⁺ OX40L ⁺ , %
ДК ₀ (контроль)	41.5 (38–47)	11.5 (9–16)	72.0 (44–87)	83.5 (76–87)	8.0 (5.5–17.0)
ДК _{LPS}	31.5 (26–37) ↓**	33.0 (16–44) ↑*	80.5 (77–91)	86.5 (81–90)	15.0 (7.8–24.0) ↑*
ДК _{дцДНК}	30.0 (27–33) ↓**	20.0 (11–38)	84.0 (81–88)	81.5 (79–91)	9.3 (5.4–24.0)
ДК _{АБ}	30.5 (23–34) ↓**	22.5 (12–43) ↑*	81.0 (79–85)	83.0 (76–88)	9.0 (6.3–20.0)
ДК _{SD-101}	37.0 (32–38)	20.0 (14–35) ↑*	82.5 (77–86)	81.0 (69–92)	7.0 (6.0–27.0)
ДК _{SD-101M}	33.5 (32–36) ↓**	18.5 (16–42) ↑*	79.0 (67–81)	82.0 (76–91)	12.5 (7.3–27.0) ↑*

Примечание. Данные трех независимых экспериментов (n = 7; % позитивных IFN-ДК) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках). Активаторы: LPS 10 мкг/мл; дцДНК 5 мкг/мл; АБ 2 нг/мл; SD-101 и SD-101M 1 мкг/мл. * p < 0.05; ** p < 0.01 – vs контроль (W-критерий Вилкоксона).

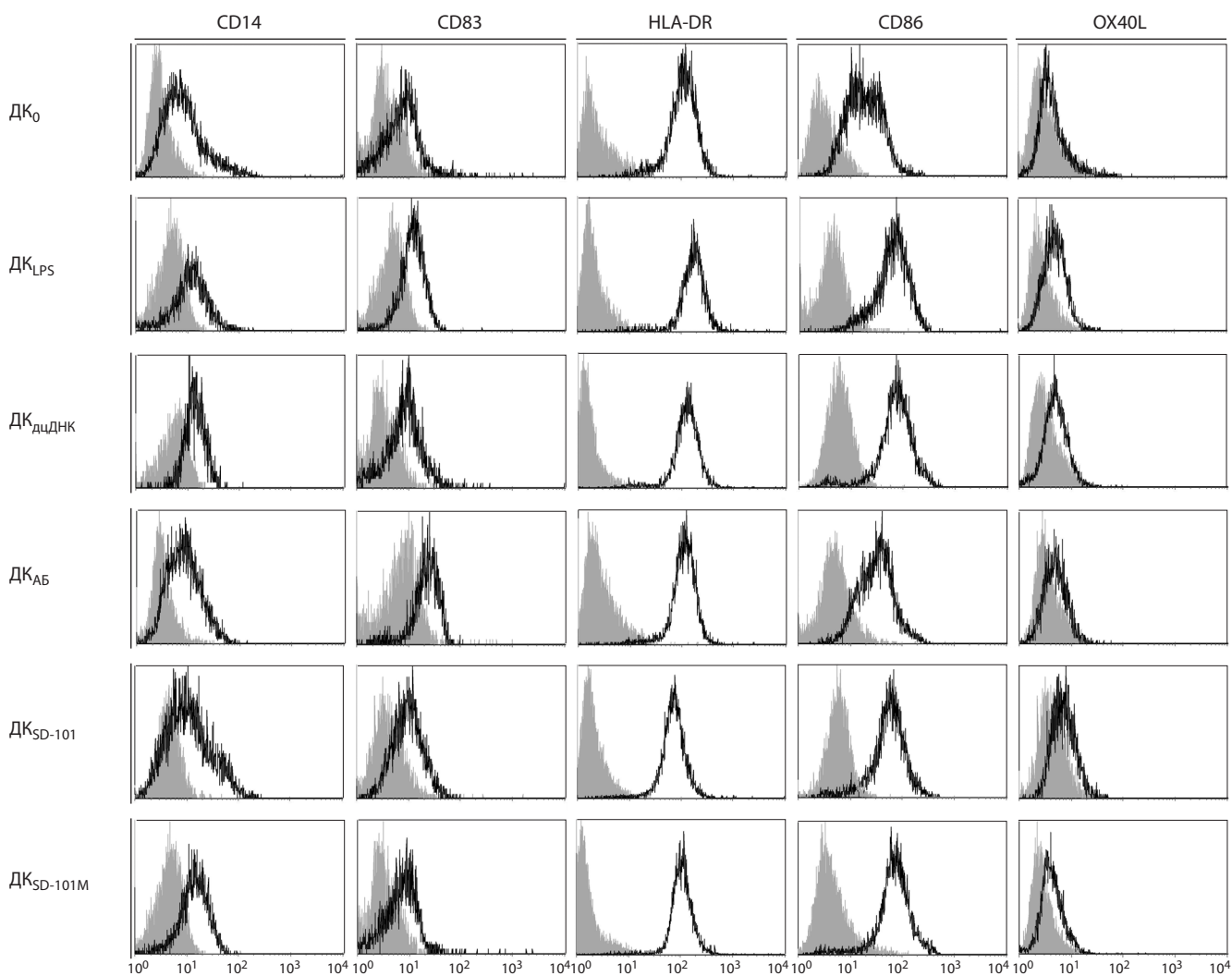


Рис. 2. Фенотипический анализ IFN-ДК, генерированных *in vitro* с различными активаторами.

Незрелые IFN-ДК культивировали с различными активаторами в течение 24 ч, затем методом проточной цитометрии оценивали поверхностную экспрессию CD14, CD83, HLA-DR, CD86, OX40L. Репрезентативные гистограммы экспрессии указанных маркеров выделены жирной линией, соответствующих изотипических контролей – серым цветом.

выраженности с LPS в дозе 10 мкг/мл, а эффективность действия μ -аналога SD-101 в дозе 1.0 мкг/мл была значимо выше, чем LPS ($p < 0.05$).

В отдельной серии экспериментов провели сравнительное исследование влияния μ -аналогов CpG-ODN

(SD-101M и D-SL03M) и активаторов класса DAMP (дцДНК, АБ) на аллостимуляторную активность двух типов дендритных клеток – IFN-ДК и IL4-ДК (табл. 3). Из представленных данных видно, что стимулирующий эффект μ -аналогов CpG-ODN в дозе 1 мкг/мл на функ-

Таблица 5. Продукция TNF- α и IFN- γ в культурах IFN-ДК, генерированных с различными активаторами

Варианты IFN-ДК		TNF- α	IFN- γ
ДК ₀ (контроль)	пг/мл	290 (206–500)	130 (90–190)
ДК _{LPS}	пг/мл	1680 (840–1790)**	225 (145–385)**
	FI	3.7 (1.4–8.4)	1.6 (1.3–2.0)
ДК _{дцДНК}	пг/мл	785 (264–1250)	250 (190–400)*
	FI	1.4 (0.9–2.7)	1.4 (1.1–2.0)
ДК _{АБ}	пг/мл	240 (145–670)	240 (185–460)*
	FI	0.9 (0.8–1.1)	1.2 (1.1–1.9)
ДК _{SD-101}	пг/мл	220 (70–490)	230 (160–460)*
	FI	0.7 (0.3–1.9)	1.71 (1.5–2.1)
ДК _{SD-101M}	пг/мл	215 (120–740)	230 (180–380)*
	FI	1.0 (0.6–1.9)	1.74 (1.3–2.1)

Примечание. Данные шести независимых экспериментов ($n = 13$) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – vs контроль (W-критерий Вилкоксона).

циональную активность IFN-ДК и IL4-ДК в алло-СКЛ был сопоставим с действием дцДНК и АБ. При этом по сравнению с IL4-ДК дендритные клетки, генерированные из моноцитов крови в присутствии интерферона-альфа (IFN-ДК), отличались большей чувствительностью к действию исследуемых соединений, поэтому дальнейшие исследования эффектов CpG-ODN проводили в культурах IFN-ДК.

Чтобы убедиться, что усиление аллостимуляторной активности обусловлено конечным созреванием ДК, изучали изменение иммунофенотипа IFN-ДК, культивируемых в присутствии CpG-ODN в сравнении с другими PAMP- и DAMP-активаторами. Для тестирования в данной серии экспериментов были отобраны CpG-ODN SD-101 и его μ -аналог SD-101M с наиболее выраженной стимулирующей активностью (табл. 4, рис. 2). Указанные CpG-ODN обладали аналогичным с LPS эффектом на созревание ДК, который проявлялся снижением числа CD14⁺ моноцитарных предшественников и увеличением доли зрелых CD83⁺ ДК, а также на уровне отчетливого тренда ДК, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD86 ($p = 0.07–0.11$). Схожий эффект был зарегистрирован для дцДНК и АБ. Интересно, что LPS тоже значительно повышал относительное содержание ДК, экспрессирующих OX40L. Прирост этих клеток составил в среднем 45 % (с 8 до 15 %). Влияние CpG-ODN с мезилфосфорамидными межнуклеотидными связями (SD-101M) на экспрессию OX40L было сопоставимо с действием LPS: количество OX40L⁺ ДК увеличилось в среднем на 39 % (до 12.5 %, $p = 0.0282$). В то же время эффект дцДНК, АБ и SD-101 с тиофосфатными группами на экспрессию OX40L был менее выраженным и статистически незначимым.

Поскольку созревание ДК сопровождается усилением продукции цитокинов с провоспалительной и Th1-стимулирующей активностью, в завершение оценили влияние CpG-ODN SD-101 и его μ -аналога SD-101M на продукцию TNF- α и IFN- γ в 5-суточных культурах IFN-ДК (табл. 5). По сравнению с незрелыми клетками LPS-активированные

ДК продуцировали более высокие уровни TNF- α и IFN- γ ($p < 0.01$). CpG-ODN SD-101 и SD-101M, так же как и АБ, не усиливали продукцию TNF- α . Концентрация TNF- α в культурах ДК в присутствии дцДНК возрастала в среднем на 43 %, но этот эффект не был статистически значимым.

В то же время SD-101 и SD-101M значимо повышали способность IFN-ДК продуцировать IFN- γ (в среднем на 71 и 74 % соответственно; $p < 0.05$), что сопоставимо с эффектом LPS. Другие DAMP-активаторы (дцДНК и АБ) также усиливали продукцию IFN- γ дендритными клетками.

Обсуждение

Полученные результаты продемонстрировали, что генерируемые из моноцитов IFN-ДК или IL4-ДК экспрессируют внутриклеточно TLR-9 и чувствительны к действию CpG-ODN класса С. Эффект CpG-ODN проявляется усилением способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ и сопряжен с возрастанием экспрессии на ДК дифференцировочных антигенов (CD83) и костимуляторных молекул (OX40L, CD86), а также продукции IFN- γ . При этом IFN-ДК характеризуются большей чувствительностью к стимулирующему действию CpG-ODN, чем IL4-ДК.

Согласно данным литературы, у мышей экспрессия TLR-9 и чувствительность к действию CpG-ODN характерна как для плазмацитоидных, так и для миелоидных ДК (Behboudi et al., 2000; Iwasaki, Medzhitov, 2004). Ранние исследования у человека, основанные на анализе RT-PCR, выявили конститутивную экспрессию мРНК TLR-9 только в плазмацитоидных ДК при ее отсутствии в миелоидных ДК или ДК моноцитарного происхождения (Bauer et al., 2001; Rothenfusser et al., 2002; Krug et al., 2001). Тем не менее позднее H. Tada обнаружил мРНК TLR-9 в генерируемых из моноцитов ДК (мо-ДК) и показал усиление продукции IL-12p70 и IFN- γ в культурах мо-ДК в ответ на стимуляцию CpG-ODN (Tada et al., 2005). В свою очередь V. Hoene с коллегами продемонстрировали наличие TLR-9

белка в мо-ДК, причем в таких же количествах, как и в плазматитоидных ДК. CpG-ODN класса А, по данным этих авторов, стимулировали созревание ДК и усиливали способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток (Hoene et al., 2006). Полученные нами данные служат еще одним подтверждением чувствительности миелоидных ДК человека к стимулирующему действию CpG-ODN и, учитывая моноцитарное происхождение большинства ДК в опухолевом микроокружении (Veglia, Gabrilovich, 2017), обосновывают перспективность использования CpG-ODN для активации ДК, в том числе при проведении внутриопухолевой иммунотерапии.

Вторым важным результатом исследования является то, что в настоящей работе впервые проведено сравнение классических тиофосфатных CpG-ODN класса С (SD-101 и D-SL03) и их оригинальных аналогов с мезилфосфорамидными (μ -модифицированными) межнуклеотидными группами (SD-101M и D-SL03M). CpG-ODN класса С совмещают иммуномодулирующие свойства CpG-ODN классов А и В (Marshall et al., 2005) и обладают выраженным иммуностимулирующим и противоопухолевым эффектом (Li et al., 2020). Так, например, L. Yang с коллегами продемонстрировали выраженную стимулирующую активность CpG-ODN D-SL03, которая проявлялась в способности активировать В-клетки, NK-клетки и Т-клетки человека *in vitro*, усилить экспрессию CD80, CD86 и HLA-DR в культурах мононуклеарных клеток, а также оказывать противоопухолевый эффект в модели рака молочной железы у мышей *in vivo* (Yang et al., 2013). В свою очередь, CpG-ODN SD-101 продемонстрировал иммуностимулирующий и противоопухолевый эффект при проведении локальной противоопухолевой иммунотерапии у человека (Levy et al., 2016; Li et al., 2020). На основе указанных CpG-ODN нами впервые получены модифицированные аналоги SD-101M и D-SL03M, содержащие мезилфосфорамидные межнуклеотидные группы, которые, согласно нашим ранним результатам, обеспечивают более высокую стабильность к ферментативному расщеплению (Miroshnichenko et al., 2019).

Сравнительный анализ активности тестируемых CpG-ODN показал, что μ -модифицированные аналоги в большей степени усиливают аллостимуляторную активность ДК, чем CpG-ODN с тиофосфатными группами. Кроме того, именно μ -форма SD-101 (SD-101M) обладает свойственной для LPS способностью усиливать в популяции IFN-ДК экспрессию молекулы OX40L, которая является важным костимуляторным сигналом, регулирующим интенсивность пролиферации Т-клеток в алло-СКЛ (Ukyo et al., 2003).

Следует отметить, что, будучи лигандом TLR-4, LPS является мощным активатором созревания ДК и часто используется в исследованиях *in vitro* в качестве положительного контроля. Сигналинг через TLR-4 вызывает возрастание экспрессии костимуляторных молекул, повышает продукцию провоспалительных цитокинов и усиливает способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и индуцировать Th1-ответ (Cehim, Chies, 2019), подтверждая иммунологическую «функциональность» активированных ДК. В исследованиях V. Hoene с коллегами стимулирующий эффект D19

(CpG-ODN класса А) на созревание и аллостимуляторную активность ДК был ниже, чем эффект LPS (Hoene et al., 2006). В наших исследованиях активность SD-101M превышала эффект LPS, а для SD-101, D-SL03 и D-SL03M была сопоставима с LPS. Усиление продукции IFN- γ под влиянием CpG-ODN (SD-101 и SD-101M) было также сопоставимо с действием LPS.

В настоящем исследовании мы сравнили CpG-ODN класса С не только с действием LPS, но и с действием DAMP-активаторов – дцДНК человека и азоксимера бромида. Оказалось, что стимулирующий эффект SD-101M на созревание ДК и их аллостимуляторную активность сопоставим с действием дцДНК и АБ. Стимулирующее влияние дцДНК на созревание и аллостимуляторную активность мо-ДК было продемонстрировано нами ранее (Alyamkina et al., 2010; Orishchenko et al., 2013). В то же время способность отечественного полимерного адьюванта на основе АБ стимулировать *in vitro* созревание ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IL-4 или IFN- α , а также усиливать их аллостимуляторную активность описана нами впервые и является важным аргументом, обосновывающим эффективность данного адьюванта в составе противовирусных вакцин. При этом надо отметить, что по ряду параметров (в частности, индукции экспрессии OX40L и продукции IFN- γ) SD-101M превосходил эффекты дцДНК и АБ.

Заключение

В целом полученные данные свидетельствуют о выраженном стимулирующем эффекте CpG-ODN класса С (SD-101 и D-SL03) на миелоидные ДК человека, который сопоставим с действием активаторов PAMP- (LPS) и DAMP-класса (дцДНК, АБ), а для мезилфосфорамидного (μ) аналога SD-101M превышает таковые. Необходимы дальнейшие исследования в мышинных экспериментальных моделях, чтобы проанализировать эффективность применения μ -модифицированных CpG-ODN (SD-101M с мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами) в противоопухолевой иммунотерапии.

Список литературы / References

- Половинкина В.С., Марков Е.Ю. Структура и иммуноадьювантные свойства CpG-ДНК. *Мед. иммунология*. 2010;12(6):469-476. DOI 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476.
- [Polovinkina V.S., Markov E.Yu. Structure and immune adjuvant properties of CpG-DNA. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2010;12(6):469-476. DOI 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476. (in Russian)]
- Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Фокина А.А., Стеценко Д.А. Новые производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидную *N*-(метансульфонил)-фосфорамидную (мезилфосфорамидную) группу. *Биорг. химия*. 2017; 43(6):644-649. DOI 10.7868/S0132342317060070.
- [Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A. New oligodeoxynucleotide derivatives containing *N*-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl phosphoramidate) internucleotide group. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017;43(6):664-668. DOI 10.1134/S1068162017060024.]
- Alyamkina E.A., Lepina O.Yu., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostani A.A., Efremov Ya.R., Shilov A.G., Orishchenko K.E., Likhacheva A.S., Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on

- maturation of dendritic cells *in vitro*. *Cell. Immunol.* 2010;266(1): 46-51. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.08.011.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Palendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:767-811. DOI 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Bauer S., Kirschning C.J., Hacker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G.B. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(16):9237-9242. DOI 10.1073/pnas.161293498.
- Behboudi S., Chao D., Klenerman P., Austyn J. The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology.* 2000;99(3): 361-366. DOI 10.1046/j.1365-2567.2000.00979.x.
- Cehim G., Chies J.A.B. *In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells methodological aspects in a comprehensive review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2019;91:e20190310. DOI 10.1590/0001-3765201920190310.
- Dyakonova V.A., Dambaeva S.V., Pinegin B.V., Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxidoionium immunomodulator and the human immune system cells. *Inter. Immunopharm.* 2004;4(13): 1615-1623. DOI 10.1016/j.intimp.2004.07.015.
- Hoene V., Peiser M., Wanner R. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J. Leuk. Biol.* 2006;80(6):1328-1336. DOI 10.1189/jlb.0106011.
- Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004;5(10):987-995. DOI 10.1038/ni1112.
- Jounai N., Kobiyama K., Takeshita F., Ishii K.J. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 2:168. DOI 10.3389/fcimb.2012.00168.
- Kabanov V.A. From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. *Pure Appl. Chem.* 2004;76(9):1659-1677. DOI 10.1351/pac.200476091659.
- Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 2014. DOI 10.3389/fimmu.2014.00461.
- Krug A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals V., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A.M., Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 2001;31(10):3026-3037. DOI 10.1002/1521-4141(200110)31:10<3026::aid-immu3026>3.0.co;2-h.
- Levy R., Reagan P.M., Friedberg J.W., Bartlett N.L., Gordon L.I., Leung A., Peterkin J., Xing B., Coffman R., Janssen R., Candia A., Khodadoust M., Frank M.J., Long S.R., Czerwinski D.K., Chu M. SD-101, a novel class C CpG-oligodeoxynucleotide (ODN) toll-like receptor 9 (TLR9) agonist, given with low dose radiation for untreated low grade B-cell lymphoma: interim results of a phase 1/2 trial. *Blood.* 2016;128(22):2974. DOI 10.1182/blood.V128.22.2974.2974.
- Li T., Wu J., Zhu S., Zang G., Li S., Lv X., Yue W., Qiao Y., Cui J., Shao Y., Zhang J., Liu Y.-J., Chen J. A novel C type CpG oligodeoxynucleotide exhibits immunostimulatory activity *in vitro* and enhances antitumor effect *in vivo*. *Front. Pharmacol.* 2020;11:8. DOI 10.3389/fphar.2020.00008.
- Marshall J.D., Fearon K.L., Higgins D., Hessel E.M., Kanzler H., Abbate C., Yee P., Gregorio J., Cruz T.D., Lizcano J.O., Zolotorev A., McClure H.M., Brasky K.M., Murthy K.K., Coffman R.L., Nest G.V. Superior activity of the type C class of ISS *in vitro* and *in vivo* across multiple species. *DNA Cell Biol.* 2005;24(2):63-72. DOI 10.1089/dna.2005.24.63.
- Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(4): 1229-1234. DOI 10.1073/pnas.1813376116.
- Orishchenko K.E., Ryzhikova S.L., Druzhinina Y.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Strunov A.A., Kiseleva E.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Sidorov S.V., Mayorov V.I., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of human double-stranded DNA preparation on the production of cytokines by dendritic cells and peripheral blood cells from relatively healthy donors. *Cancer Ther.* 2013;8:191-205.
- Powell B.S., Andrianov A.K., Fusco P.C. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2015;4(1):23-45. DOI 10.7774/cevr.2015.4.1.23.
- Rothenfusser S., Tuma E., Endres S., Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum. Immunol.* 2002;63(12):1111-1119. DOI 10.1016/s0198-8859(02)00749-8.
- Scheiermann J., Klinman D.M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine.* 2014;32(48):6377-6389. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.06.065.
- Shirota H., Klinman D.M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines.* 2014;13(2):299-312. DOI 10.1586/14760584.2014.863715.
- Shirota H., Tross D., Klinman D.M. CpG oligonucleotides as cancer vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel).* 2015;3(2):390-407. DOI 10.3390/vaccines3020390.
- Tada H., Aiba S., Shibata K., Ohteki T., Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.* 2005;73(12):7967-7976. DOI 10.1128/IAI.73.12.7967-7976.2005.
- Ukyo N., Hori T., Yanagita S., Ishikawa T., Uchiyama T. Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive human T-cell response. *Immunology.* 2003;109(2):226-231. DOI 10.1046/j.1365-2567.2003.01648.x.
- Veglia F., Gabrilovich D.I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.* 2017;45:43-51. DOI 10.1016/j.coi.2017.01.002.
- Yang L., Wu X., Wan M., Yu Y., Yu Y., Wang L. CpG oligodeoxynucleotides with double stem-loops show strong immunostimulatory activity. *Int. Immunopharmacol.* 2013;15(1):89-96. DOI 10.1016/j.intimp.2012.10.020.

ORCID ID

A.A. Ostanin orcid.org/0000-0001-6895-938X
O.Y. Leplina orcid.org/0000-0003-3169-8643
E.A. Burakova orcid.org/0000-0001-6644-5959
T.V. Tyrinova orcid.org/0000-0002-7987-2017
A.A. Fokina orcid.org/0000-0001-5692-2483
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382
D.A. Stetsenko orcid.org/0000-0002-5215-5704
E.R. Chernykh orcid.org/0000-0003-2346-6279

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 18-29-09045 и частично грантом Министерства образования и науки РФ (проект FSUS-2020-0035).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.05.2020. После доработки 05.08.2020. Принята к публикации 11.08.2020.

Пикобирнавирусы: распространенность, генетическое разнообразие, методы детекции

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

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

 e-mail: a.kashn@yandex.ru


Аннотация. Обзор посвящен пикобирнавирусам (ПБВ) – мелким безоболочечным изометрическим вирусам, таксономически относящимся к роду *Picobirnavirus* (PBV) семейства *Picobirnaviridae*, с геномом, представленным двумя сегментами двуцепочечной РНК. На основании публикаций за 1988–2019 гг. представлена информация о распространенности пикобирнавирусов в природе, о широком спектре поражаемых хозяев. Раскрыт оппортунистический характер ПБВ инфекции и подчеркивается отсутствие ясной картины в понимании роли ПБВ в качестве этиологического агента диареи, поскольку эти вирусы выявляются и при отсутствии симптомов заболевания. Рассматривается концепция, обосновывающая представление о ПБВ инфекции как о хроническом заболевании, обусловленном длительной персистенцией вируса в организме хозяина. Причины высокой частоты выявления ПБВ у людей и животных объясняются влиянием таких факторов, как стрессовый синдром, физиологическое состояние, иммунный статус и возраст хозяина при первичном инфицировании. Отмечается возможный зоонозный характер ПБВ инфекции человека, природа которого объясняется способностью этих вирусов к межвидовой трансмиссии, приобретенной в ходе эволюции благодаря реассортации сегментов генома разных вирусов, инфицировавших одного хозяина. Приводятся данные, доказывающие принадлежность ПБВ к вирусам эукариот, а также ставящая эти факты под сомнение гипотеза о возможной принадлежности ПБВ к вирусам бактерий. Подчеркнута необходимость активизации работ по выявлению ПБВ в связи с их широким распространением, несмотря на сложность из-за отсутствия системы для их культивирования. В качестве основных способов их детекции рассмотрены две стратегии ОТ-ПЦР ПБВ. Приведена характеристика геномов отдельных представителей рода, выделенных от разных хозяев. Акцент сделан на целесообразности разработки праймеров с более широкой специфичностью для увеличения диапазона выявляемых представителей рода ПБВ в связи с огромным разнообразием их генотипов. Подчеркивается важность эффективного мониторинга распространенности ПБВ для изучения их зоонозного и антропонозного потенциала с помощью метагеномного анализа, а также возможность использования этих вирусов в качестве перспективного маркера для мониторинга за чистотой окружающей среды. Ключевые слова: пикобирнавирус; сегмент генома; фрагмент сегмента генома; ОТ-ПЦР; праймер; ампликон; секвенирование.

Для цитирования: Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Пикобирнавирусы: распространенность, генетическое разнообразие, методы детекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):661-672. DOI 10.18699/VJ20.660

Picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, detection methods

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

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

 e-mail: a.kashn@yandex.ru

Abstract. This article presents a general overview of the prevalence, genetic diversity and detection methods of picobirnaviruses (PBVs), which are small, non-enveloped icosahedral viruses with a segmented double-stranded RNA genome consisting of two segments taxonomically related to the genus *Picobirnavirus* of the family *Picobirnaviridae*. This review of scientific papers published in 1988–2019 provides data on the PBV distribution in the nature and a broad host range. PBV infection is characterized as opportunistic, the lack of understanding of the etiological role of PBVs in diarrhea is emphasized, since these viruses are detected both in symptomatic and asymptomatic cases. The concept of PBV infection as a chronic disease caused by a long-lasting persistence of the virus in the host is considered. Such factors as stress syndrome, physiological conditions, immune status and host age at the time of primary PBV infection influence the virus detection rate in humans and animals. The possible zoonotic nature of human PBV infection is noted due to the capacity for interspecies PBV transmission acquired during evolution as a result of the reassortment of the genome segments of different viruses infecting the same host. Data providing evidence that PBVs belong to eukaryotes and a challenging hypothesis stating that PBVs are bacterial viruses are presented. The need to intensify work on PBV detection because of their wide distribution, despite the complexity due to the lack of the cultivation system, is emphasized. Two strategies of RT-PCR as main PBV detection methods

are considered. The genomes of individual representatives of the genus isolated from different hosts are characterized. Emphasis is placed on the feasibility of developing primers with broader specificity for expanding the range of identifiable representatives of the genus PBV due to a huge variety of their genotypes. The importance of effective monitoring of PBV prevalence for studying the zoonotic and anthroponotic potential using metagenomic analysis is highlighted, and so is the possibility of using PBV as a marker for environmental monitoring.

Key words: picobirnavirus; genomic segment; specific genomic fragment; RT-PCR; primer; amplicon; sequencing.

For citation: Kashnikov A.Yu., Epifanova N.V., Novikova N.A. Picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, detection methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):661-672. DOI 10.18699/VJ20.660

История открытия пикобирнавирусов

В 1988 г. в Бразилии при исследовании фекалий больных острым гастроэнтеритом методом электрофореза в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) с целью выявления сегментированного генома ротавирусов в ряде образцов впервые были обнаружены профили из двух полос (Pereira et al., 1988a). Сходные профили были выявлены и при исследовании содержимого кишечника крыс (Pereira et al., 1988b). Данные сегменты представляли собой двуцепочечную РНК (дцРНК). Их длина оценивалась по электрофоретической подвижности примерно в 2.6 и 1.5 тыс. пар оснований для медленно- и быстромигрирующего сегментов соответственно. Эта РНК коседиментировала в градиенте хлористого цезия при плотности 1.39–1.40 г/мл с однородными частицами диаметром ~35 нм с нечеткой структурой поверхности, выявляемыми при электронномикроскопическом исследовании образцов. Авторы предложили для новых, ранее не описанных мелких вирусов с бисегментированным РНК-овым геномом название «пикобирнавирусы» (от *pico* – мелкий, *bi* – два, *RNA* – РНК), в отличие от известных, более крупных бирнавирусов, инфицирующих птиц, рыб, насекомых и моллюсков.

Дальнейшие исследования показали широкую распространённость пикобирнавирусов (ПБВ). Они были обнаружены в фекалиях наземных и морских млекопитающих, рептилий, птиц (Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Conceicao-Neto et al., 2016; Navarro et al., 2018), в дыхательных путях свиней (Smits et al., 2011) и людей (Smits et al., 2012), у рыб, беспозвоночных (Delmas et al., 2019), грибов (Yinda et al., 2018), а по последним данным, и у бактерий (Krishnamurthy, Wang, 2018). Хронология обнаружения ПБВ у человека и животных по данным с 1988 по 2018 г. представлена в таблице.

Таксономия

Пикобирнавирусы (сем. *Picobirnaviridae*) – семейство безоболочечных мелких сферических вирусов, относящееся по классификации Балтимора к III классу вирусов с двуцепочечным РНК-геномом (<https://viralzone.expasy.org>). Семейство состоит из одного рода *Picobirnavirus*, объединяющего вирусы пяти генетически варьируемых классов (геногрупп) (Luo et al., 2018).

Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) в 2008 г. ПБВ были разделены на два вида: пикобирнавирус человека и пикобирнавирус кролика (Delmas et al., 2019). Пикобирнавирусы других хозяев до настоящего времени не утверждены в качестве типовых видов и считаются неклассифицированными (Malik et al., 2014; Takiuchi et al., 2016). Кроме того, до конца не ясно, эукариоты или

бактерии являются естественным хозяином ПБВ (Krishnamurthy, Wang, 2018). Информация о таксономии *Picobirnaviridae* доступна в кратком изложении отчета ICTV по ссылке www.ictv.global/report/picobirnaviridae. Таксономически ближайшими родственниками ПБВ считаются вирусы семейства *Partitiviridae*, имеющие с ними сходную структуру капсида и организацию генома (Delmas et al., 2019). Естественные хозяева партитивирусов – грибы и растения (Vainio et al., 2018).

Структурная и молекулярная организация ПБВ

Морфологически вирионы ПБВ представляют собой безоболочечные частицы диаметром 35–40 нм с нечеткой структурой поверхности (рис. 1) (Rosen et al., 2000; Wakuda et al., 2005; Duquerroy et al., 2009; Collier et al., 2016). Капсид обладает кубическим (икосаэдрическим) типом симметрии, имеет 30-стороннюю (триаконтаэдрическую) организацию и состоит из 60 асимметричных субъединиц, являющихся гомодимерами (рис. 2). Эти субъединицы формируют 60 выступов на поверхности капсида. Поскольку каждая из субъединиц является димером, то в общей сложности капсид состоит из 120 белковых молекул, что позволяет при характеристике симметрии вириона отнести ПБВ к структурам с триангуляционным числом T, равным 2. В капсиде имеются каналы, связывающие внутреннюю полость с поверхностью вириона (Duquerroy et al., 2009).

Заметно отличаясь по архитектуре капсида от вирусов высших эукариот, имеющих дцРНК (*Reoviridae*), ПБВ схожи с дцРНК-вирусами семейства *Partitiviridae* (Ochoa et al., 2008). Однако, по последним данным, в отличие от партитивирусов ПБВ могут инфицировать кроме грибковых клеток-хозяев также прокариотические клетки (Knox et al., 2018).

Геном ПБВ состоит из двух сегментов двуцепочечной РНК, размеры которых различаются у вирусов, выделенных от разных видов животных. При электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) эти сегменты расходятся относительно друг друга на определенное расстояние. При этом формируются два типа электрофореграмм: с «большим» (сегменты расположены выше) профилем генома (2.7 и 1.9 тыс. п. о. для сегментов 1 и 2 соответственно) и с «малым» профилем (сегменты расположены ниже, 2.2 и 1.2 тыс. п. о.) (рис. 3) (Duquerroy et al., 2009).

Более крупный сегмент 1 генома ПБВ может состоять из двух или трех рамок считывания (open reading frame – ORF). Следует отметить, что в большинстве работ сегмент 1 генома ПБВ схематически представлен в виде двух ORF, например в схемах геномов ПБВ человека (Rosen et

История выявления ПБВ

Год обнаружения	Хозяин ПБВ	Место обнаружения	Исследователи
1988	Человек, крыса	Бразилия	Pereira et al.
	Курица	»	Alfieri et al.
1989	Свинья	»	Gatti et al.
	Морская свинка	»	Pereira et al.
1990	Теленок	Болгария	Vanopdenbosch, Wellemans
1991	Жеребенок	Великобритания и Ирландия	Browning et al.
1993	Кролик	Великобритания	Gallimore et al.
1996	Коза, овца	Испания	Munoz et al.
1999	Хомяк, крыса, гигантский муравьед	Бразилия	Haga et al.
2001	Собака	»	Volotão et al.
2007	Осел	Аргентина	Masachessi et al.
	Обезьяна	США	Wang et al.
2009	Змея	Бразилия	Fregolente et al.
2010	Индейка	Калифорния, США	Day et al.
2012	Страус	Южная Америка	Masachessi et al.
	Морской лев	Гонконг, Китай	Woo et al.
2013	Лисица	Нидерланды	Bodewes et al.
	Летучая мышь	Регионы Китая	Yang et al.
	Гигантские кошки	Уругвай	Gillman et al.
2014	Верблюд	Гонконг, Китай	Woo et al.
2015	Орангутанг	Юго-Восточная Азия	Masachessi et al.
2016	Волк	Португалия	Conceicao-Neto et al.
2017	Косуля	Словения	Kuhar et al.
2018	Крупный рогатый скот	Бразилия	Navarro et al.
2016–2018	Рыбы, беспозвоночные, моллюски, водоросли	Китай	Shi et al.

al., 2000), свиньи (Carruyo et al., 2008), быка (Ghosh et al., 2009), морского льва (Woo et al., 2012), лисицы (Bodewes et al., 2013), индейки (Verma et al., 2015), лошади (Li et al., 2015), гориллы (Duraisamy et al., 2018), сурка (Luo et al., 2018). В ряде других работ сегмент 1 состоит из трех ORF, как, например, в схемах геномов кролика (Green et al., 1999), косули (Kuhar et al., 2017) и курицы (Boros et al., 2018).

В схемах, где сегмент 1 состоит из трех рамок считывания, самая маленькая рамка ORF1 кодирует полипептид, включающий всего несколько десятков аминокислот. Так, в схеме генома ПБВ человека (штамм Ну005102), представленной King et al. (2012), ORF1, предшествующая двум большим рамкам – ORF2 и ORF3, кодирующим пептиды из 224 и 552 аминокислот, состоит всего из 39 кодонов (рис. 4). В схемах геномов кролика, косули и курицы в исследованиях (Green et al., 1999; Kuhar et al., 2017; Boros et al., 2018) ORF1 немного больше: 55, 63 и 188 кодонов соответственно. Функциональность рамки ORF1 неясна, в связи с чем некоторые исследователи даже не всегда упоминают о ее присутствии (Boros et al., 2018).

Рамка ORF2 в схемах с сегментом 1, состоящим из трех ORF, кодирует так называемый гидрофильный пептид, содержащий консервативные повторяющиеся последовательности, что является одной из основных особенностей генома ПБВ (Boros et al., 2018). Есть предположение, что

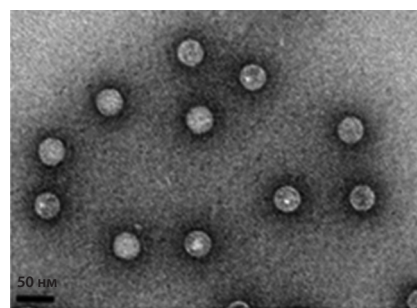


Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения очищенных и сконцентрированных частиц ПБВ, из (Collier et al., 2016). Гексагональный контур частиц служит доказательством их икосаэдрической симметрии.

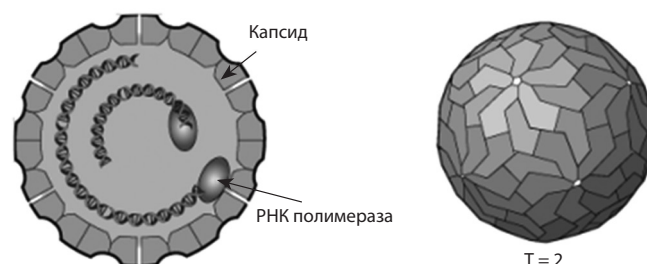


Рис. 2. Вирион ПБВ, из https://viralzone.expasy.org/by_species/740

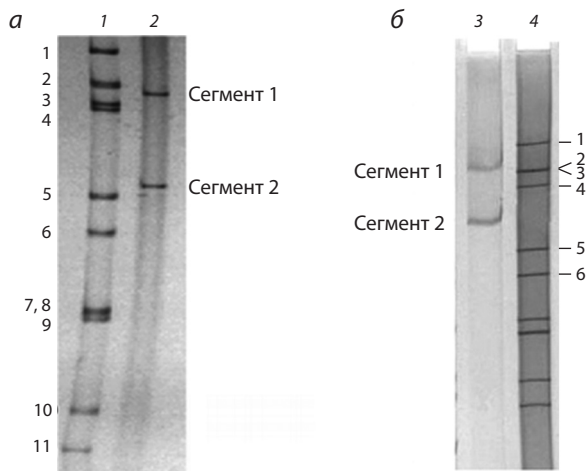


Рис. 3. «Большой» (а) и «малый» (б) профили миграции сегментов РНК ПБВ в ПААГ в сравнении с профилем миграции РНК ротавирусов, из (Wakuda et al., 2005; Ghosh et al., 2009).

1 – ротавирус обезьян SA-11; 2 – ПБВ человека Hu005102; 3 – ПБВ крупного рогатого скота RUBV-P; 4 – ротавирус человека D5-1.

рамки ORF1 и ORF2 при транскрипции могут сдвигаться и генерировать один длинный белок (Green et al., 1999).

Третья, наибольшая, рамка считывания (ORF3) в сегменте 1 ПБВ кодирует белок капсида вируса, состоящий из 552–591 аминокислот. Рамки могут перекрываться. В схеме King et al. (2012) соединение ORF1–ORF2 перекрывается восемью нуклеотидами, а ORF2–ORF3 – одним нуклеотидом.

Меньший по размеру сегмент 2 генома пикобирнавирусов содержит одну ORF, кодирующую фермент РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA-dependent-RNA-polymerase – RdRp) (см. рис. 4). По различиям в специфичности гена RdRp в сегменте 2 генома пикобирнавирусы делят на геногруппы (Malik et al., 2014).

Кроме описанных выше «типичных» ПБВ, с помощью ЭФ в ПААГ были обнаружены «атипичные» ПБВ, сначала в фекалиях телят (Vanopdenbosch, Wellemans, 1989), а позднее – в фекалиях человека (Gallimore et al., 1995a; Khramtsov et al., 1997). У «атипичных» ПБВ геном меньше, чем у «типичных» (размеры 1-го и 2-го сегментов РНК составляют 1.75–1.79 и 1.37–1.55 тыс. п. о. соответственно), и отличается по месту расположения генов, кодирующих

функциональные белки (Gallimore et al., 1995b; Khramtsov et al., 1997). Если у «типичных» ПБВ вирусную РНК-полимеразу кодирует сегмент 2, а сегмент 1 кодирует капсидный белок, то у «нетипичных» – наоборот.

Как правило, геном ПБВ сегментирован (Duquerroy et al., 2009; Delmas et al., 2019). Однако недавно были описаны несколько несегментированных геномов ПБВ, принадлежащих к различным генетическим кластерам, в частности у ПБВ лошадей (Li et al., 2015), гималайских сурков (Luo et al., 2018), рыб и беспозвоночных (Shi et al., 2016). Установлено, что между ПБВ с сегментированным и несегментированным геномом существует эволюционная связь, которая обусловлена возможностью перехода из одной формы в другую (Luo et al., 2018). Оказалось, что геном ПБВ сурка может находиться как в сегментированной, так и в несегментированной форме. Несегментированный геном содержит три рамки считывания – ORF1, ORF2, ORF3, кодирующие гидрофильный белок, капсидный белок и RdRp соответственно (Luo et al., 2018).

Исследования ПБВ, проведенные с помощью секвенирования, показали, что вирусы чрезвычайно вариабельны (Bányai et al., 2003, 2008; Carruyo et al., 2008; Smits et al., 2011; Ganesh et al., 2014; Malik et al., 2014; Li et al., 2015; Duraisamy et al., 2018; Luo et al., 2018). Вариабельность генома ПБВ объясняется характерной для них генетической изменчивостью, обусловленной не столько изменением первичной структуры в результате мутаций, сколько способностью к реассортации между сегментами генома (Woo et al., 2019).

До 2014 г. на основе изучения коротких неполных последовательностей гена RdRp исследователями выделялись две основные геногруппы ПБВ (Malik et al., 2014). При анализе последовательностей ПБВ, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pnuccore>) по состоянию на 17.07.2014 отмечено (Malik et al., 2014), что 83.11 % последовательностей принадлежат ПБВ геногруппы I (GI) и только 2.52 % – геногруппы II (GII), что соотносится с распространенностью представителей этих геногрупп в природе.

Однако результаты дальнейших исследований показали, что диапазон генетического разнообразия ПБВ гораздо шире и не может быть охарактеризован только двумя геногруппами. В 2014–2015 гг. появились сообщения об обнаружении нового генетического варианта ПБВ в образцах фекалий человека (Smits et al., 2014) и в окружающей

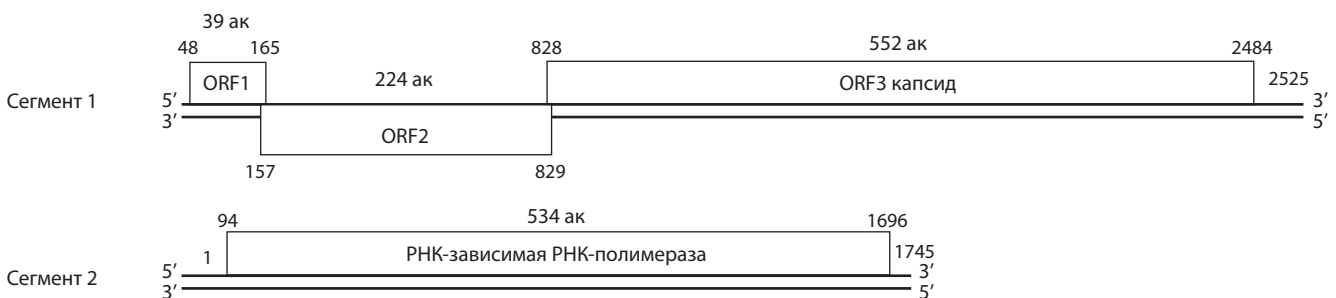


Рис. 4. Схематическое изображение расположения генов в сегментах 1 и 2 дцРНК штамма Hu005102 пикобирнавируса человека, из (King et al., 2012).

Числа указывают положение нуклеотидов; ак – аминокислота.

среде (Zhang S. et al., 2015). Новые ПБВ человека проявили низкое сходство (19.4–26.1 %) по последовательности аминокислот в продукте гена RdRp с ПБВ человека генотипов I и II, что позволило отнести их к генотипу III (PBV GIII/Homo sapiens/VS6600008/2008/NL/KJ206569 в GenBank). В 2015 г. у лошадей были выявлены пикобирнавирусы, которые при филогенетическом анализе аминокислотных последовательностей участка РНК-зависимой РНК-полимеразы размером 450 аминокислот формировали отдельные кластеры и были отнесены к двум новым генотипам – GIV и GV (Li et al., 2015).

Таким образом, в настоящее время по специфическим участкам гена RdRp пикобирнавирусы делят на пять генотипов: GI–GV. При этом сходство аминокислотных последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы внутри генотипов варьирует от 44.8 до 97.1 %, тогда как между генотипами – от 21.6 до 30.8 % (Li et al., 2015). У человека выделены ПБВ четырех генотипов: GI, GII, GIII (Smits et al., 2014) и GV (Ng et al., 2014). У сурка выявлены все пять генотипов ПБВ (Luo et al., 2018). Пикобирнавирусы генотипа GIII обнаружены в диатомовых водорослях и у беспозвоночных животных (Shi et al., 2016, 2018; Delmas et al., 2019).

Согласно принятой в настоящее время номенклатуре пикобирнавирусов, предложенной Fregolente et al. (2009), название штамма начинается с обозначения генотипа (GI–GV), за которым следует аббревиатура PBV, общее название видов-хозяев, трехбуквенный код страны, название штамма и год изоляции, разделенные косой чертой. С использованием данной номенклатуры штаммы ПБВ, выделенные у человека и индока, получили следующие обозначения: GI/PBV/human/BRA/PBV_RVH275/2013 (ПБВ человека) и GI/PBV/turkey/USA/MN-1/2011 (ПБВ индока).

Опportunистический характер ПБВ инфекции. О персистенции ПБВ

Несмотря на то что ПБВ часто обнаруживаются у животных и людей с диареей отдельно и в коинфекции с другими патогенами (Ganesh et al., 2014), их роль в качестве возбудителя кишечного расстройства остается недоказанной, поскольку они выявляются и при отсутствии симптомов заболевания (Masachessi et al., 2007; Martínez et al., 2010; Verma et al., 2015). Например, в исследовании Verma et al. (2015) показано, что экскреция ПБВ у индюков не была связана с симптомами диареи. Из 80 образцов фекалий от птиц с диареей и 40 образцов без диареи ПБВ содержались в 39 (48.8 %) и 23 (57.5 %) соответственно.

Не обнаружено и явной связи с диареей при выявлении ПБВ у людей и животных, зараженных другими патогенами, вызывающими гастроэнтерит. Для установления этиологической роли ПБВ необходимы подбор подходящей для размножения вируса клеточной культуры, а также эксперименты на гнотобиотических животных (Ganesh et al., 2014).

Уже с конца 1990-х гг. ПБВ стали идентифицировать как оппортунистов за их способность провоцировать диарею у зараженных первичным патогеном животных или людей с ослабленным иммунитетом и в дальнейшем проявляться у них в виде хронического заболевания с признаками и без признаков диареи (Giordano et al., 1998;

González et al., 1998; Martínez et al., 2003; Masachessi et al., 2007, 2012; Ghosh et al., 2009). Существует концепция об оппортунистическом (условно-патогенном) характере ПБВ инфекции, которая представлена в обзоре (Ganesh et al., 2014) и других сообщениях, основанных на результатах обследования здоровых животных на наличие ПБВ (Masachessi et al., 2007; Carruyo et al., 2008; Martínez et al., 2010). Хронический характер ПБВ инфекции в этой концепции объясняется длительной персистенцией вируса в организме хозяина (Ganesh et al., 2014). Персистирующий характер инфекции проявляется чередованием периодов «молчания», при которых вирус не удается выявить даже с применением высокочувствительных методов, с периодами низкой и высокой вирусной экскреции. При этом у инфицированных ПБВ хозяев могут отсутствовать симптомы диареи, но на протяжении всей жизни они будут оставаться носителями вируса и служить резервуарами инфекции. В частности, результаты исследования Carruyo et al. (2008) показали, что ПБВ могут инфицировать молодых поросят в возрасте от 7 до 56 дней (более 10–12 % от числа обследованных) и выделяться у них без признаков болезни.

Уровень экскреции вируса вирусонесителями обусловлен рядом факторов, таких как стрессовый синдром, физиологическое состояние, возраст первично инфицируемого, иммунный статус хозяев и условия окружающей среды (биотические и абиотические факторы). Перечисленные факторы способствуют росту вирусной нагрузки. При взятии проб с учетом этих факторов удавалось обнаружить пикобирнавирусы методом ЭФ в ПЛАГ с большей частотой.

Зависимость уровня выявления ПБВ от стресса, обусловленного неволей хозяина, в 2014–2015 гг. наблюдали у африканских зеленых обезьян с Карибских островов (Gallagher et al., 2017). Было обследовано 270 обезьян без диареи, 160 из которых обитали в дикой природе, 110 – содержались в неволе и участвовали в научных экспериментах. Методом ЭФ в ПЛАГ пикобирнавирусы были обнаружены у 16 обезьян (14.5 %), содержащихся в неволе в стрессовых условиях эксперимента. Ни один из образцов фекалий обезьян, находящихся на свободе, не дал положительных результатов на ПБВ (Gallagher et al., 2017).

Исследователи из Аргентины отметили зависимость уровня выявления ПБВ от физиологического состояния животных, в частности периода репродукции, на примере свиней (Martínez et al., 2010). Наблюдения показали, что ПБВ оставался в организме хозяина как постоянная инфекция, при которой периоды его низкой и высокой экскреции чередовались с периодами «молчания». Низкие уровни экскреции ПБВ обнаруживались с помощью обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в течение всего периода исследования. При резком возрастании уровня экскреции ПБВ у свиней, наблюдаемом в период родов и грудного вскармливания, вирус выявлялся не только с помощью ОТ-ПЦР, но и методом ЭФ в ПЛАГ. Самый высокий уровень экскреции вируса приходился на лактогенный период. В это время положительными на ПБВ оказались 38.02 % проб, взятых от 71 свиноматки. Далее по активности экскреции следовал заключительный период беременности и родов: 15.09 % проб в группе из 53 беременных свиноматок (Martínez et al., 2010).

Показана зависимость уровня экскреции ПБВ от возраста животного. В работе (Takiuchi et al., 2016) из 289 фекальных проб, взятых у телят возрастом до 60 дней и проанализированных ЭФ в ПААГ, ПБВ были обнаружены в 8.3 % случаев (24/289). Martínez et al. (2010) наблюдали высокий уровень экскреции ПБВ у молодняка свиней в возрасте 2–5 мес. (18.42 %), тогда как у взрослых самцов экскреции не найдено. Исследование на индейках также выявило изменение частоты обнаружения ПБВ (Verma et al., 2015). Из 80 образцов фекалий индеек 39 (48.8 %) были положительными на ПБВ. При этом максимальное количество образцов было ПБВ-положительно у индюшат в возрасте двух (20/20) и трех (15/20) недель. Резкое снижение уровня экскреции ПБВ у индеек (2/20), наблюдаемое на восьмой неделе, свидетельствовало о решающем влиянии на этот процесс их возраста.

Уровень экскреции ПБВ зависит также от иммунного статуса хозяина. Установлено, что у людей с ослабленным иммунитетом ПБВ обнаруживаются чаще (Giordano et al., 1998, 1999; González et al., 1998). Так, при исследовании 197 фекальных образцов от ВИЧ-инфицированных и неинфицированных пациентов с диареей и без диареи методом ЭФ в ПААГ пикобирнавирусы были найдены у 8.8 % из 57 ВИЧ-инфицированных больных с диареей (Giordano et al., 1998). У неинфицированных ВИЧ пациентов без диареи ПБВ не обнаружены. В ходе дальнейших исследований авторы укрепились во мнении о взаимосвязи уровня экскреции ПБВ с диареей у ВИЧ-инфицированных. При анализе 244 фекальных образцов, собранных от ВИЧ-инфицированных и неинфицированных пациентов с диареей и без диареи, ПБВ были обнаружены у 14.63 % из 82 ВИЧ-инфицированных больных с диареей и не обнаружены ни в одном случае при отсутствии диареи и в группе неинфицированных ВИЧ (Giordano et al., 1999). При определенном уровне экскреции ПБВ признаки диареи у ВИЧ-инфицированных пациентов могут отсутствовать, но ПБВ выявляются, как, например, в работе (González et al., 1998), где у 2.3 % из 125 ВИЧ-инфицированных пациентов без диареи на момент обследования были обнаружены ПБВ.

На уровень экскреции ПБВ могут оказывать влияние биотические факторы окружающей среды, такие как первичные патогены. В ряде исследований ПБВ обнаруживаются чаще при коинфекции с первичными возбудителями диареи, например ротавирусами (Kuhar et al., 2017) или норовирусами (Bányai et al., 2003). Предполагают, что при коинфекции ПБВ с основными возбудителями при диарее наблюдается синергический эффект (Malik et al., 2014; Kulla et al., 2019).

На вирусную активность влияют и климатические факторы – солнечный свет (Masachessi et al., 2015), температура и влажность (Ribeiro et al., 2014). Все перечисленные факторы необходимо учитывать при выявлении ПБВ.

Зоонозный характер ПБВ инфекции.

Способность ПБВ к межвидовой трансмиссии

Значительная часть вирусных заболеваний человека имеет зоонозное происхождение. На зоонозный характер ПБВ инфекции указывает обнаружение генетически родственных ПБВ у людей и животных. В частности, у

свиней в Венгрии, Венесуэле и Аргентине были выявлены ПБВ геногруппы I, которые при секвенировании генома проявили генетическое сходство с ПБВ человека геногруппы I (Bányai et al., 2008; Carruyo et al., 2008; Giordano et al., 2011). Сообщалось об обнаружении у детей в Калькутте штаммов ПБВ, генетически связанных со штаммами ПБВ свиней (Ganesh et al., 2010, 2011a). Штаммы ПБВ лошадей, выделенные из фекалий домашних жеребят в Калькутте (Индия), показали генетическую связь со штаммами ПБВ человека из того же города (Ganesh et al., 2011b). Обнаружены генетически сходные ПБВ у людей и лис (Lojkić et al., 2016), у людей и летучих мышей (Yinda et al., 2019). Так, авторы последнего сообщения отмечали, что причиной зоонозной передачи ПБВ человеку от летучих мышей у жителей Камеруна стала охота на летучих мышей и употребление их в пищу (Yinda et al., 2019).

Зоонозная передача ПБВ – один из вариантов межвидовой трансмиссии, способность к которой была приобретена пикобирнавирусами в процессе эволюции благодаря процессу реассортации сегментов их генома при одновременном инфицировании одной клетки ПБВ разных видов (McDonald et al., 2016). Обусловленная реассортацией генетическая лабильность могла привести в ходе эволюции или к генетическому сближению (конвергенции) штаммов ПБВ, принадлежащих разным хозяевам, или, наоборот, к генетической дивергенции – генетическому отдалению ПБВ, принадлежащим хозяевам одного вида (Lojkić et al., 2016).

Способность к межвидовой трансмиссии ПБВ находит подтверждение как в случаях зоонозного заражения, так и в случаях инфицирования пикобирнавирусами человека животных, например молодых свиней (Carruyo et al., 2008) или лошадей (Ganesh et al., 2011b). Геномы некоторых штаммов ПБВ свиней оказались идентичны геномам штаммов ПБВ человека геногруппы I (Ganesh et al., 2014). В 2011 г. были обнаружены генетически сходные ПБВ в респираторных трактах свиней и человека (Smits et al., 2011, 2012).

Генетическая дивергенция родственных штаммов ПБВ была продемонстрирована в работе (Zhang B. et al., 2014). Так, три из четырех ПБВ свиней, выявленных в исследовании, оказались генетически ближе к ПБВ человека, чем к ранее охарактеризованному ПБВ свиней.

Возможен и перенос штаммов ПБВ от одного хозяина к другому через загрязненные фекалиями неочищенные сточные воды (Symonds et al., 2009). В экологическом исследовании Symonds et al. (2009) отмечается, что высокая частота обнаружения ПБВ в сточных и очищенных водах (100 и 33 % соответственно) может служить показателем (маркером) фекального загрязнения при мониторинге качества воды в природных водоемах.

Гипотеза о фаговой природе ПБВ

Считают, что ПБВ – это вирусы животных, так как обычно их выявляют в образцах стула животных. Однако до сих пор не найдена модель животного или клеточная культура для их размножения. Недавно индийские ученые выдвинули и обосновали экспериментально предположение, что ПБВ могут быть РНК-вирусами прокариот (Krishnamurthy, Wang, 2018). Гипотеза основана на том, что в

геноме ПБВ перед тремя открытыми рамками считывания выше кодонов инициации в сегменте 1 и перед ORF в сегменте 2, подобно вирусам прокариот с РНК-геномом, присутствуют консервативные SD-участки, называемые последовательностями Шайна–Дальгарно (Shine–Dalgarno sequence). Такие участки представляют собой гексамеры (AGGAGG), предшествующие кодонам, иницирующим трансляцию последовательностей вирусного генома. У вирусов бактерий эти гексамеры являются сайтами связывания с бактериальными рибосомами и служат для усиления эффективности трансляции вирусных белков. Например, такие сайты присутствуют в геноме у некоторых бактериофагов семейства *Cystoviridae* с сегментированным дцРНК-геномом (Boros et al., 2018).

Предположение, что ПБВ представляют собой новое семейство РНК-бактериофагов, нашло подтверждение также в работе (Adriaenssens et al., 2018). Авторы продемонстрировали высокую частоту присутствия в геноме ПБВ гексамеров AGGAGG. Напротив, у вирусов эукариот из различных семейств, проанализированных в данном исследовании, SD-сайты встречались с низкой частотой и в основном представляли собой тетрамеры (AGGA, GGAG, GAGG). Результаты, подтверждающие гипотезу о фаговой природе ПБВ, были получены и в исследовании (Boros et al., 2018), где тоже выявлено присутствие SD-участков в геноме куриных ПБВ перед тремя ORF выше кодонов инициации в сегменте 1 и одной ORF в сегменте 2.

Если предположить, что ПБВ являются вирусами прокариот, то можно объяснить их распространенность и наличие широкого спектра хозяев. Бактериофаги широко распространены в природе. Их обнаруживают в воде, почве, пищевых продуктах, различных выделениях людей и животных, т. е. там, где встречаются бактерии.

Выявление у разных видов животных штаммов ПБВ с генетически родственными последовательностями генома можно объяснить, предположив, что хозяевами ПБВ являются бактерии, встречающиеся в кишечнике у разных позвоночных и беспозвоночных. При этом авторы фаговой гипотезы (Krishnamurthy, Wang, 2018) считают, что ПБВ размножаются только в бактериях определенного вида, в геноме которых присутствует прокариотическая SD-последовательность (сайт связывания с бактериальными рибосомами) в большинстве генов (более 10 %). К таким бактериям относятся *Firmicutes*, в геноме которых насчитывается более 80 % генов с прокариотической SD-последовательностью (Omota et al., 2015).

Авторы указывают, что даже вирусные семейства, включающие виды, чьи геномы обогащены SD-последовательностями, являются исключительно прокариотическими вирусными семействами. Приобретение инфицированными животными иммунитета к ПБВ также не противоречит фаговой гипотезе, поскольку установлено, что иммунные ответы хозяина могут возникать и против бактериальных вирусов (Dabrowska et al., 2005; Górski et al., 2006). Вполне возможно, что ПБВ вызывают иммунный ответ на заражение не клеток человека, а бактериальных клеток, составляющих его микробиом, что опять-таки не исключает возможности того, что ПБВ – это прокариотические вирусы.

Наличие у капсидного белка ПБВ перфорационной активности, а значит, способности к транслокации через клеточную мембрану (Duquerroy et al., 2009) как доказательства того, что он может инфицировать клетки животных, тоже не противоречит фаговой гипотезе, поскольку известно, что и представители семейства бактериальных РНК-вирусов обладают способностью выхода из клетки (Reed et al., 2013). Процесс взаимодействия ПБВ человека и животных с клеткой хозяина напоминает взаимодействие вирулентного фага с бактерией, которое протекает в несколько стадий: проникновение в бактериальную клетку, автономная репродукция в ней и лизис бактерии. Следовательно, и перфорация липосом ПБВ не исключает их принадлежности к прокариотическим РНК-вирусам.

Суммируя аргументы в пользу фаговой гипотезы, можно заключить, что, вероятно, ПБВ относятся к новому семейству РНК-вирусов, которые инфицируют определенный тип бактерий, имеющих геном с высоким содержанием SD-последовательностей (более 80 % генов). Эти бактерии населяют кишечный тракт животных и человека; ими могут быть бактерии *Firmicutes*, содержащие SD-последовательности для большинства своих генов.

Перечисленные аргументы убедительно показывают, что ПБВ действительно могут заражать прокариот, а не эукариот. А если на самом деле ПБВ заражают бактерий, то необходимо изменить подход к их изучению: направить усилия на поиск хозяина для их размножения среди прокариотических клеток, а не эукариотических. Разделение семейств вирусов прокариот и эукариот по частоте присутствия в геноме SD-последовательностей позволит проводить идентификацию новых семейств вирусов прокариот.

Таким образом, окончательное доказательство фаговой природы ПБВ требует подбора хозяина для его размножения. По всей вероятности, до тех пор, пока не будет достигнуто успешное культивирование ПБВ в конкретных бактериальных культурах, фаговая природа ПБВ останется на уровне гипотезы. Идентификация истинного бактериального или архейного хозяина ПБВ (если таковые имеются) видится весьма сложной задачей, если не забывать о том, что кишечный микробиом состоит из нескольких сотен в основном некультивируемых бактерий (Boros et al., 2018).

Стратегии ОТ-ПЦР-амплификации, используемые для секвенирования и генотипирования ПБВ

До применения методов амплификации нуклеиновых кислот (ОТ-ПЦР) частота обнаружения ПБВ оставалась крайне низкой, поскольку метод электрофореза геномной РНК в полиакриламидном геле обладает низкой чувствительностью (Masachessi et al., 2007). Кроме того, ПБВ являются очень лабильными агентами. Исходно положительные образцы, обнаруженные методом ЭФ в ПААГ, становятся отрицательными после нескольких процедур замораживания–размораживания (Gallimore et al., 1995a).

О низкой частоте выявления ПБВ методом ЭФ в ПААГ свидетельствует работа аргентинских вирусологов (Giordano et al., 2008). За 25-летний период (с января 1977 г. по декабрь 2002 г.) эти авторы собрали 2224 образца стула у детей с диареей. В ходе исследования образцов мето-

дом ЭФ в ПААГ было выявлено всего два положительных результата (0.09 %). Аналогичные результаты получены в наших исследованиях при детекции ротавирусов методом ЭФ в ПААГ в образцах фекалий детей в возрасте до 14 лет с острой кишечной инфекцией, поступающих в инфекционные стационары Нижнего Новгорода и Нижегородской области. За 1994–2001 гг. ПБВ были обнаружены только в трех из 4535 исследованных образцов (Новикова и др., 2003). В дальнейшем, с июля 2006 г. по январь 2010 г., ПБВ были выявлены в 0.08 % из 3645 образцов фекалий от детей с гастроэнтеритом (Епифанова и др., 2010).

Использование метода ЭФ в ПААГ ограничивало частоту выявления ПБВ, поскольку при низких титрах вируса в большинстве клинических образцов экскреция вируса не обнаруживалась (Gallimore et al., 1995a; Giordano et al., 1998). О низкой частоте выявления ПБВ с помощью ЭФ в ПААГ сообщалось в работах (Ludert, Liprandi, 1993; Pereira et al., 1993; Cascio et al., 1996) при исследовании спорадических случаев гастроэнтерита у детей в Венесуэле (0.5 %), Бразилии (0.5 %) и Италии (0.43 %) соответственно. Однако при вспышках гастроэнтерита, когда уровень экскреции вируса был высоким, вирус выявлялся методом ЭФ в ПААГ с существенно большей частотой. Например, Pereira et al. (1988a), описывая обнаружение ПБВ у человека, сообщали о частоте до 20 % при вспышках гастроэнтерита в Бразилии.

Внедрение технологий ОТ-ПЦР-амплификации и секвенирования способствовало повышению частоты обнаружения ПБВ в различных объектах живой природы. Так, при исследовании образцов стула новорожденных поросят с помощью ОТ-ПЦР было получено 60 % положительных на ПБВ проб (87 из 144) против 27 %, обнаруженных методом электрофореза в ПААГ (Carruyo et al., 2008). Информация, предоставленная в работе (Martínez et al., 2010), о распространенности свиного ПБВ в Аргентине также демонстрирует существенно большие возможности метода ОТ-ПЦР по сравнению с ЭФ в ПААГ: методом ЭФ в ПААГ пикобирнавирусы были выделены только при высоком уровне экскреции ПБВ, обусловленном возрастом, первичной инфекцией и физиологическим статусом хозяина, тогда как с помощью ОТ-ПЦР они обнаруживались в течение всего периода исследования и при низких уровнях экскреции.

Применение этих методов позволило установить, что ПБВ в природе распространены шире, чем считалось ранее (Boros et al., 2018). В частности, методом ОТ-ПЦР группа исследователей из Нидерландов обнаружила нуклеотидные последовательности ПБВ геногруппы I в 17 образцах (20 %) из 83 от пациентов с диареей (van Leeuwen et al., 2010). Тем же методом ПБВ были выявлены в 18 из 77 (23.4 %) проанализированных образцов бычьего стула из разных регионов Бразилии (Navarro et al., 2018). Высокий уровень обнаружения ПБВ с помощью метода ОТ-ПЦР был продемонстрирован при обследовании стада овец в Бразилии (Kunz et al., 2018), где 62 % проанализированных образцов кала были ПБВ-положительными.

Для выявления ПБВ в большинстве исследований используют две стратегии специфической амплификации: стратегию «одного праймера» и стратегию двух фланкирующих праймеров. Первая стратегия основана на лиги-

ровании вирусной РНК, выступающей в роли матрицы, с адаптером в виде олигонуклеотида с последующим синтезом на этой матрице кДНК с помощью праймера, комплементарного адаптеру. Данный метод, разработанный Lambden et al. (1992) для проведения амплификации у вирусов с сегментированными дцРНК геномами, в дальнейшем был применен для амплификации генома ПБВ (Wakuda et al., 2005; Ghosh et al., 2009; Wang et al., 2012; Boros et al., 2018). В частности, Wakuda et al. (2005) стратегию «одного праймера» с некоторыми модификациями применили для получения кДНК полноразмерных сегментов 1 и 2 РНК ПБВ человека (штамм Ну005102).

К стратегии ПЦР-амплификации с использованием одного праймера прибегают, как правило, для характеристики полноразмерных сегментов генома ПБВ. Для генотипирования ПБВ по коротким специфическим фрагментам генома, позволяющим дать характеристику штамма с определением его геногруппы, применяют вторую стратегию специфической амплификации, предусматривающую использование пары праймеров, фланкирующих выбранный фрагмент вирусного генома. Эти праймеры сконструированы на основе геномного сегмента двух штаммов ПБВ – 4-GA-9 и 1-CHN-97, выделенных в США и Китае соответственно (Rosen et al., 2000).

Применительно к ПБВ человека мишенью для праймеров являются специфические консервативные участки (мотивы) в геномном сегменте 2 ПБВ, кодирующем РНК-зависимую РНК-полимеразу. Для обнаружения геномной группы I применяют прямой и обратный праймеры PicoB25 и PicoB43, которые фланкируют фрагмент гена RdRp размером 201 п. о. (в позиции 665–679 и 850–865 сегмента 2). Для обнаружения геномной группы II используют пару праймеров PicoB23 и PicoB24, фланкирующих фрагмент RdRp размером 369 п. о. (в позиции 685–699 и 1039–1053).

Эти праймеры могут быть использованы не только для генотипирования ПБВ человека (Rosen et al., 2000), но и для генетической характеристики ПБВ некоторых животных, в частности свиней (Bányai et al., 2008). Однако они не способны распознавать весь спектр штаммов ПБВ, циркулирующих среди людей, свиней и других хозяев, по причине узкой специфичности (Bányai et al., 2008; Carruyo et al., 2008; Ganesh et al., 2010, 2011a; Martínez et al., 2010). В связи с этим для расширения специфичности при выявлении последовательностей сегментов генома ПБВ в дальнейшем появились праймеры, фланкирующие другие вырожденные участки гена RdRp (Carruyo et al., 2008; van Leeuwen et al., 2010; Verma et al., 2015; Wilburn et al., 2016; Woo et al., 2019), а также праймеры с более широким диапазоном обнаружения представителей рода *Picobirnavirus* (Malik et al., 2017; Ghosh et al., 2018; Kleymann et al., 2020).

В частности, анализ ОТ-ПЦР, способный обнаруживать вирусы рода *Picobirnavirus* у широкого круга хозяев, включая животных и человека, был разработан Malik et al. (2017). Универсальные для этого рода праймеры подбирали по результатам выравнивания нуклеотидных последовательностей консервативных областей гена RdRp. Наилучшие результаты с точки зрения специфичности и чувствительности в ОТ-ПЦР дала пара вырожденных

праймеров PBV-7F (позиция 754–771 сегмента 2) и PBV-7R (позиция 1011–1028). Эти праймеры фланкировали ампликон размером 275 п. о. Разработанный метод позволил эффективно амплифицировать данный участок гена RdRp у всех протестированных ПБВ, инфицирующих разные виды хозяев, и не давал ложноположительных результатов при тестировании на других вирусах.

Применение праймеров с широкой специфичностью, кроме расширения диапазона выявления представителей рода ПБВ, позволяет амплифицировать последовательности большей протяженности. В частности, Ghosh et al. (2018) с помощью широкоспецифического концевых праймера амплифицировали область гена RdRp, перекрывающую сразу несколько консервативных участков, и в результате смогли охарактеризовать полный геномный сегмент 2 ПБВ крысы, предоставив важную информацию о генетическом разнообразии и эволюции ПБВ у крыс.

Недавно Kleumann et al. (2020) для выявления ПБВ от разных видов мангуста разработали пару праймеров с широкой специфичностью, PBV 1.2FP и PBV 1.2RP, амплифицирующих значительную часть (1229 п. о. из ~1700 п. о.) гена RdRp. Эта пара праймеров способна обнаружить ПБВ, выделенные от разных хозяев и имеющие различия по первичной структуре (Kleumann et al., 2020). Для выявления среди положительных образцов ПБВ мангуста геновариантов, относящихся к геногруппе I, авторы применили комбинацию известного обратного праймера PicoB43 (Rosen et al., 2000) и прямого праймера PBV-7F, позволившую амплифицировать участок сегмента 2 размером 390 п. о.

В последние годы в диагностике вирусных инфекций стал широко применяться метагеномный анализ (Adriaenssens et al., 2018; Boros et al., 2018; Duraisamy et al., 2018; Yinda et al., 2019; Wille et al., 2019). Метод метагеномного анализа основан на технологии секвенирования нового поколения, позволяющей выявить генетический материал всех микроорганизмов, находящихся в отдельной пробе или образце среды – метагеноме. В отличие от ПЦР-технологий, требующих эталонных последовательностей, с помощью которых можно обнаруживать только известные вирусы, метагеномный анализ позволяет выявлять вирусы с новым генотипом (Adriaenssens et al., 2018). Причем новые генотипы могут выявляться чаще, чем уже известные (Duraisamy et al., 2018; Wille et al., 2019).

Метагеномный анализ характеризует как вирусное многообразие, так и частоту встречаемости отдельных вирусов в метагеноме. Например, по данным (Adriaenssens et al., 2018), метагеном из сточных вод содержал представителей родов *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, и только пикобирнавирусы были обнаружены во всех без исключения образцах сточных вод. В публикации (Boros et al., 2018) сообщается, что с помощью метода метагеномного анализа из общего числа прочитанных последовательностей (13016), присутствующих в метагеноме, который представляет собой фекальный образец курицы, в 516 считываниях были выявлены пикобирнавирусы. В исследовании (Yinda et al., 2019) с применением метагеномного анализа образцов фекалий жителей Камеруна с наличием и отсутствием признаков гастроэнтерита (после контакта с летучими мышами)

было обнаружено, что 28 из 63 пулов содержали чтения, аннотированные как *Picobirnaviridae*, с большинством положительных пулов от людей в возрастных группах старше 20 лет. Эти факты свидетельствуют о высоком уровне встречаемости ПБВ в живой природе.

Заключение

Резюмируя представленную в обзоре информацию, которая получена из публикаций о ПБВ за рассматриваемый период их изучения, можно сделать следующие заключения.

- Для ПБВ характерен широкий спектр хозяев и убиквитарность распространения.
- Роль ПБВ как причины гастроэнтерита еще до конца не ясна из-за отсутствия клеточной культуры или модели животных для их культивирования. Это в значительной степени препятствует выделению вируса и клинико-патологическим исследованиям.
- Частота выявления ПБВ неодинакова в разных исследованиях, но установлено, что она связана с физиологическим состоянием и условиями окружающей среды.
- Существует гипотетическое объяснение распространения ПБВ инфекции, основанное на представлении о ПБВ как условно-патогенных вирусах, согласно которому взрослые инфицированные хозяева с нормальным иммунитетом могут быть носителями ПБВ и служить в качестве резервуаров вирусов, без проявления симптомов диареи.
- Обнаружение у разных животных штаммов ПБВ с генетически родственными последовательностями генома указывает на возможный зоонозный характер инфекции для человека и способность ПБВ к эффективной трансмиссионной передаче.
- Являясь самыми распространенными в сточных водах, ПБВ лучше других вирусов коррелируют с присутствием в природных водоемах опасных для человека патогенных вирусов и, следовательно, могут служить потенциальным маркером для мониторинга качества воды в этих водоемах.
- ПБВ существенно различаются генетически. На сегодняшний день идентифицировано пять геногрупп ПБВ (GI–GV).
- Выдвинуто предположение, что ПБВ могут инфицировать прокариот, являясь не вирусами млекопитающих, а новым семейством РНК-бактериофагов. В пользу своего предположения его авторы приводят убедительные аргументы, показывающие, что ПБВ действительно могут заражать прокариот, а не эукариот, в частности бактерий *Firmicutes*. Однако до тех пор, пока не будет подобран хозяин для размножения ПБВ, такое предположение остается гипотетическим.

Представленная информация позволяет характеризовать ПБВ как вирусы генетически вариабельные, с широким спектром хозяев, быстро эволюционирующие и легко распространяющиеся. Для более полного изучения их биологии, этиологической роли в возникновении заболеваний и патогенного потенциала необходимы эксперименты на гнотобиотических животных. Молекулярная характеристика новых штаммов ПБВ от разных хозяев даст ценную информацию о происхождении, передаче,

распространении и генетическом разнообразии этих быстро эволюционирующих вирусов с дцРНК для изучения их зоонозного и антропонозного потенциала, а также для возможного использования в качестве перспективного маркера мониторинга чистоты окружающей среды.

Список литературы / References

- Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Зверев В.В., Пономарева Н.В., Парфенова О.В., Новиков Д.В., Волкова М.А., Новикова Н.А. Этиологическая структура вирусных кишечных инфекций у детей в Нижнем Новгороде. *Мед. альманах*. 2010;2(11):233-236.
- [Epifanova N.V., Lukovnikova L.B., Golitsyna L.N., Fomina S.G., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Parfenova O.V., Novikov D.V., Volkova M.A., Novikova N.A. Etiological structure of viral intestinal infections in children in Nizhny Novgorod. *Meditsynskii Almanah = Medical Almanac*. 2010;2(11):233-236. (in Russian)]
- Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Федорова О.Ф., Голицына Л.Н., Куприянова Н.В. Обнаружение пикобирнавировусов методом электрофореза РНК в полиакриламидном геле. *Вопр. вирусологии*. 2003;48(6):41-43.
- [Novikova N.A., Epifanova N.V., Fedorova O.F., Golitsyna L.N., Kupriyanova N.V. Detection of picobirnaviruses by electrophoresis of RNA in polyacrylamide gel. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2003;48(6):41-43. (in Russian)]
- Adriaenssens E.M., Farkas K., Harrison C., Jones D.L., Allison H.E., McCarthy A.J. Viromic analysis of wastewater input to a river catchment reveals a diverse assemblage of RNA viruses. *mSystems*. 2018; 3(3):1-18. DOI 10.1128/mSystems.00025-18.
- Bányai K., Jakab F., Reuter G., Bene J., Uj M., Meleg B., Szucs G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch. Virol.* 2003;148:2281-2291. DOI 10.1007/s00705-003-0200-z.
- Bányai K., Martella V., Bogdán A., Forgách P., Jakab F., Meleg E., Bíró H., Meleg B., Szucs G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J. Gen. Virol.* 2008;89:534-539. DOI 10.1099/vir.0.83134-0.
- Bodewes R., van der Giessen J., Haagmans B.L., Osterhaus A.D.M.E., Smits S.L. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J. Virol.* 2013;87(13): 7758-7764. DOI 10.1128/JVI.00568-13.
- Boros Á., Polgár B., Pankovics P., Fenyvesi H., Engelmann P., Phan T.G., Delwart E., Reuter G. Multiple divergent picobirnaviruses with functional prokaryotic Shine-Dalgarno ribosome binding sites present in cloacal sample of a diarrheic chicken. *Virol. J.* 2018; 525:62-72. DOI 10.1016/j.virol.2018.09.008.
- Carruyo G.M., Mateu G., Martínez L.C., Pujol F.H., Nates S.V., Liprandi F., Ludert J.E. Molecular characterization of porcine picobirnaviruses and development of a specific reverse transcription-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46:2402-2405. DOI 10.1128/JCM.00655-08.
- Cascio A., Bosco M., Vizzi E., Giammanco A., Ferraro D., Arista S. Identification of *Picobirnavirus* from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. *Eur. J. Epidemiol.* 1996;12:545-547. DOI 10.1007/BF00144011.
- Collier A.M., Lyytinen O.L., Guo Y.R., Toh Y., Poranen M.M., Tao Y.J. Initiation of RNA polymerization and polymerase encapsidation by a small dsRNA virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(4):1-26. DOI 10.1371/journal.ppat.1005523.
- Conceicao-Neto N., Mesquita J.R., Zeller M., Yinda C.K., Álvares F., Roque S., Petrucci-Fonseca F., Godinho R., Heylen E., Van Ranst M., Matthijnsens J. Reassortment among picobirnaviruses found in wolves. *Arch. Virol.* 2016;161(10):2859-2862. DOI 10.1007/s00705-016-2987-4.
- Dabrowska K., Switala-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 2005;98:7-13. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02422.x.
- Delmas B., Attoui H., Ghosh S., Malik Y.S., Mundt E., Vakharia V.N., ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Picobirnaviridae*. *J. Gen. Virol.* 2019;100:133-134. DOI 10.1099/jgv.0.001186.
- Duquerroy S., Da Costa B., Henry C., Vigouroux A., Libersou S., Lepault J., Navaza J., Delmas B., Rey F.A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *EMBO J.* 2009;28(11):1655-1665. DOI 10.1038/emboj.2009.109.
- Duraisamy R., Akiana J., Davoust B., Mediannikov O., Michelle C., Robert C., Desnues C. Detection of novel RNA viruses from free-living gorillas, Republic of the Congo: genetic diversity of picobirnaviruses. *Virus Genes*. 2018;54(2):256-271. DOI 10.1007/s11262-018-1543-6.
- Fregolente M.C., de Castro-Dias E., Martins S.S., Spilki F.R., Allegritti S.M., Gatti M.S. Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Res.* 2009;143(1):134-136. DOI 10.1016/j.virusres.2009.03.006.
- Gallagher C.A., Navarro R., Cruz K., Aung M.S., Ng A., Bajak E., Beierschmitt A., Lawrence M., Dore K.M., Ketzis J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Detection of picobirnaviruses in vervet monkeys (*Chlorocebus sabaeus*): molecular characterization of complete genomic segment-2. *Virus Res.* 2017;230:13-18. DOI 10.1016/j.virusres.2016.12.021.
- Gallimore C.I., Appleton H., Lewis D., Green J., Brown D.W. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. *J. Med. Virol.* 1995a;45(2):135-140. DOI 10.1002/jmv.1890450204.
- Gallimore C.I., Green J., Casemore D.P., Brown D.W. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Arch. Virol.* 1995b;140(7):1275-1278. DOI 10.1007/bf01322752.
- Ganesh B., Banyai K., Masachessi G., Mladenova Z., Nagashima S., Ghosh S., Pativada M., Kumar R., Kobayashi N. Genogroup I picobirnavirus in diarrhoeic foals: can the horse serve as a natural reservoir for human infection? *Vet. Res.* 2011b;42(1):52. DOI 10.1186/1297-9716-42-52.
- Ganesh B., Masachessi G., Mladenova Z. Animal picobirnavirus. *Virus Dis.* 2014;25(2):223-238. DOI 10.1007/s13337-014-0207-y.
- Ganesh B., Nagashima S., Ghosh S., Nataraju S.M., Rajendran K., Manna B., Ramamurthy T., Niyogi S.K., Kanungo S., Sur D., Kobayashi N., Krishnan T. Detection and molecular characterization of multiple strains of Picobirnavirus causing mixed infection in a diarrhoeic child: emergence of prototype Genogroup II-like strain in Kolkata, India. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2011a;2(1):61-72.
- Ganesh B., Nataraju S.M., Rajendran K., Ramamurthy T., Kanungo S., Manna B., Nagashima S., Sur D., Kobayashi N., Krishnan T. Detection of closely related picobirnaviruses among diarrhoeic children in Kolkata: evidence of zoonoses? *Infect. Genet. Evol.* 2010;10(4): 511-516. DOI 10.1016/j.meegid.2010.02.008.
- Ghosh S., Kobayashi N., Nagashima S., Naik T.N. Molecular characterization of full-length genomic segment 2 of a bovine picobirnavirus (PBV) strain: evidence for high genetic diversity within genogroup I PBVs. *J. Gen. Virol.* 2009;90(10):2519-2524. DOI 10.1099/vir.0.013987-0.
- Ghosh S., Shiokawa K., Aung M.S., Malik Y.S., Kobayashi N. High detection rates of picobirnaviruses in free roaming rats (*Rattus* spp.): molecular characterization of complete gene segment-2. *Infect. Genet. Evol.* 2018;65:131-135. DOI 10.1016/j.meegid.2018.07.024.
- Giordano M.O., Martinez L.C., Rinaldi D., Guinard S., Naretto E., Casero R., Yacci M.R., Depetris A.R., Medeot S.I., Nates S.V. Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1998;18(4):380-383. DOI 10.1097/00042560-199808010-00010.
- Giordano M.O., Martinez L.C., Rinaldi D., Espul C., Martinez N., Isa M.B., Depetris A.R., Medeot S.I., Nates S.V. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 1999;15(16):1427-1432. DOI 10.1089/08892299309937.

- Giordano M.O., Martinez L.C., Masachessi G., Barril P.A., Ferreyra L.J., Isa M.B., Valle M.C., Massari P.U., Nates S.V. Evidence of closely related *Picobirnavirus* strains circulating in humans and pigs in Argentina. *J. Infect.* 2011;62:45-51. DOI 10.1016/j.jinf.2010.09.031.
- Giordano M.O., Masachessi G., Martinez L.C., Barril P.A., Ferreyra L.J., Isa M.B., Nates S.V. Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977–2002). *J. Infect.* 2008;56(5):371-375. DOI 10.1016/j.jinf.2008.02.017.
- González G.G., Pujol F.H., Liprandi F., Deibis L., Ludert J.E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J. Med. Virol.* 1998;55(4):288-292. DOI 10.1002/(sici)1096-9071(199808)55:4<288::aid-jmv6>3.0.co;2-x.
- Górski A., Kniotek M., Perkowska-Ptasińska A., Mróz A., Przerwa A., Gorczyca W., Dąbrowska K., Weber-Dąbrowska B., Nowaczyk M. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant. Proc.* 2006;38:331-333. DOI 10.1016/j.transproceed.2005.12.073.
- Green J., Gallimore C.I., Clewley J.P., Brown D.W. Genomic characterisation of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. *Arch. Virol.* 1999;144(12):2457-2465. DOI 10.1007/s007050050658.
- Khrantsov N.V., Woods K.M., Nesterenko M.V., Dykstra C.C., Upton S.J. Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Microbiol.* 1997;26(2):289-300. DOI 10.1046/j.1365-2958.1997.5721933.x.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Pt. II. The Viruses. (Family *Picobirnaviridae*). Elsevier; Acad. Press, 2012;535-539.
- Kleymann A., Becker A.A.M.J., Malik Y.S., Kobayashi N., Ghosh S. Detection and molecular characterization of picobirnaviruses (PBVs) in the mongoose: identification of a novel PBV using an alternative genetic code. *Viruses.* 2020;12(1):99. DOI 10.3390/v12010099.
- Knox M.A., Gedye K.R., Hayman D.T.S. The challenges of analysing highly diverse picobirnavirus sequence data. *Viruses.* 2018;10(12):1-13. DOI 10.3390/v10120685.
- Krishnamurthy S.R., Wang D. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. *Virology.* 2018;516:108-114. DOI 10.1016/j.virol.2018.01.006.
- Kuhar U., Vengust G., Jamnikar-Ciglenecki U. Complete genome sequence of roe deer picobirnavirus strain PBV/roe_deer/SLO/D38 14/2014. *Genome Announc.* 2017;5(50):e01329-17. DOI 10.1128/genomeA.01329-17.
- Kunz A.F., Possatti F., de Freitas J.A., Alfieri A.A., Takiuchi E. High detection rate and genetic diversity of picobirnavirus in a sheep flock in Brazil. *Virus Res.* 2018;255:10-13. DOI 10.1016/j.virusres.2018.06.016.
- Kylla H., Dutta T.K., Roychoudhury P., Subudhi P.K. Coinfection of diarrheagenic bacterial and viral pathogens in piglets of Northeast region of India. *Vet. World.* 2019;12(2):224-230. Publ. online 2019, Feb 9. DOI 10.14202/vetworld.2019.224-230.
- Lambden P.R., Cooke S.J., Caul E.O., Clarke I.N. Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. *J. Virol.* 1992;66:1817-1822.
- Li L., Giannitti F., Low J., Keyes C., Ullmann L.S., Deng X., Aleman M., Pesavento P.A., Pusterla N., Delwart E. Exploring the virome of diseased horses. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(9):2721-2733. DOI 10.1099/vir.0.000199.
- Lojkić I., Biđin M., Prpić J., Šimić I., Krešić N., Bedeković T. Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2016;45:10-15. DOI 10.1016/j.cimid.2016.01.005.
- Ludert J.E., Liprandi F. Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. *Res. Virol.* 1993;144:219-224. DOI 10.1016/S0923-2516(06)80032-4.
- Luo X.L., Lu S., Jin D., Yang J., Wu S.S., Xu J. Marmota himalayana in the Qinghai–Tibetan plateau as a special host for bi-segmented and unsegmented picobirnaviruses. *Emerg. Microbes. Infect.* 2018;7(1):20. DOI 10.1038/s41426-018-0020-6.
- Malik Y.S., Kumar N., Sharma K., Dhama K., Shabbir M.Z., Ganesh B., Banyai K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric *Picobirnaviruses* of animal origin and their relationship to human strains. *BioMed. Res. Int.* 2014;780752. DOI 10.1155/2014/780752.
- Malik Y.S., Sharma A.K., Sharma K., Sircar S., Dhama K. RNA polymerase gene based RT-PCR assay with primers update for genus specific detection of picobirnaviruses. *J. Anim. Plant Sci.* 2017; 27(2):582-588.
- Martínez L.C., Giordano M.O., Isa M.B., Alvarado L.F., Paván J.V., Rinaldi D., Nates S.V. Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. *Intervirology.* 2003;46(4):207-213. DOI 10.1159/000072429.
- Martínez L.C., Masachessi G., Carruyo G., Ferreyra L.J., Barril P.A., Isa M.B., Giordano M.O., Ludert J.E., Nates S.V. *Picobirnavirus* causes persistent infection in pigs. *Infect. Genet. Evol.* 2010;10:984-988. DOI 10.1016/j.meegid.2010.06.004.
- Masachessi G., Ganesh B., Martínez L.C., Giordano M.O., Barril P.A., Isa M.B., Paván G.V., Mateos C.A., Nates S.V. Maintenance of picobirnavirus (PBV) infection in an adult orangutan (*Pongo pygmaeus*) and genetic diversity of excreted viral strains during a three-year period. *Infect. Genet. Evol.* 2015;29:196-202. DOI 10.1016/j.meegid.2014.11.019.
- Masachessi G., Martínez L.C., Ganesh B., Giordano M.O., Barril P.A., Isa M.B., Ibars A., Pavan J.V., Nates S.V. Establishment and maintenance of persistent infection by picobirnavirus in greater rhea (*Rhea Americana*). *Arch. Virol.* 2012;157(11):2075-2082. DOI 10.1007/s00705-012-1400-1.
- Masachessi G., Martínez L.C., Giordano M.O., Barril P.A., Isa B.M., Ferreyra L., Villareal D., Carello M., Asis C., Nates S.V. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. *Arch. Virol.* 2007;152(5):989-998. DOI 10.1007/s00705-006-0900-2.
- McDonald S.M., Nelson M.I., Turner P.E., Patton J.T. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(7):448-460. DOI 10.1038/nrmicro.2016.46.
- Navarro J.O., Candido M., de Almeida-Queiroz S.R., Buzinaro M.D.G., Livonesi M.C., Fernandes A.M., de Sousa R.L.M. Genetic diversity of bovine Picobirnavirus, Brazil. *Virus Genes.* 2018;54(5):724-728. DOI 10.1007/s11262-018-1586-8.
- Ng T.F., Vega E., Kondov N.O., Markey C., Deng X., Gregoricus N., Vinje J., Delwart E. Divergent picobirnaviruses in human feces. *Genome Announc.* 2014;2(3):e00415-14.
- Ochoa W.F., Havens W.M., Sinkovits R.S., Nibert M.L., Ghabrial S.A., Baker T.S. Partitivirus structure reveals a 120-subunit, helix-rich capsid with distinctive surface arches formed by quasisymmetric coat-protein dimers. *Structure.* 2008;16(5):776-786. DOI 10.1016/j.str.2008.02.014.
- Omotajo D., Tate T., Cho H., Choudhary M. Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes. *BMC Genom.* 2015;16(1):604. DOI 10.1186/s12864-015-1808-6.
- Pereira H.G., Fialho A.M., Flewett T.H., Teixeira J.M.S., Andrade Z.P. Novel viruses in human faeces. *Lancet.* 1988a;332(8602):103-104. DOI 10.1016/S0140-6736(88)90032-3.
- Pereira H.G., Flewett T.H., Candeias J.A.N., Barth O.M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *J. Gen. Virol.* 1988b;69:2749-2754. DOI 10.1099/0022-1317-69-11-2749.
- Pereira H.G., Linhares A.C., Candeias J.A., Glass R.I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 1993;27:224-233.
- Reed C.A., Langlais C., Wang I.-N., Young R. A₂ expression and assembly regulates lysis in Qβ infections. *Microbiol. (Reading, England).* 2013;159:507-514. DOI 10.1099/mic.0.064790-0.

- Ribeiro S.R., Bezerra D.A., Kaiano J.H., de Souza Oliveira D., Silvestre R.V., Gabbay Y.B., Ganesh B., Mascarenhas J.D. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. *J. Gen. Virol.* 2014;95(1):117-122. DOI 10.1099/vir.0.054783-0.
- Rosen B.I., Fang Z.-Y., Glass R.I., Monroe S.S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology.* 2000;277(2):316-329. DOI 10.1006/viro.2000.0594.
- Shi M., Lin X.D., Chen X., Tian J.H., Chen L.J., Li K., Wang W., Eden J.S., Shen J.J., Liu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature.* 2018;556(7700):197-202. DOI 10.1038/s41586-018-0012-7.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., Qin X.C., Li J., Cao J.P., Eden J.S., Buchmann J., Wang W., Xu J., Holmes E.C., Zhang Y.Z. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature.* 2016;540(7634):539-543. DOI 10.1038/nature20167.
- Smits S.L., Poon L.L., van Leeuwen M., Lau P.N., Perera H.K., Peiris J.S., Simon J.H., Osterhaus A.D. Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(12):2328-2330. DOI 10.3201/eid1712.110934.
- Smits S.L., Schapendonk C.M., van Beek J., Vennema H., Schürch A.C., Schipper D., Bodewes R., Haagmans B.L., Osterhaus A.D., Koopmans M.P. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(7):1218-1222. DOI 10.3201/eid2007.140190.
- Smits S.L., van Leeuwen M., Schapendonk C.M., Schürch A.C., Bodewes R., Haagmans B.L., Osterhaus A.D. Picobirnaviruses in the human respiratory tract. *Emerg. Infect. Dis.* 2012;18(9):1539-1540. DOI 10.3201/eid1809.120507.
- Symonds E.M., Griffin D.W., Breitbart M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75:1402-1409. DOI 10.1128/AEM.01899-08.
- Takiuchi E., Macedo R., Kunz A.F., Gallego J.C., de Mello J.L., Otonel R.A., Alfieri A.A. Electrophoretic RNA genomic profiles of Brazilian Picobirnavirus (PBV) strains and molecular characterization of a PBV isolated from diarrheic calf. *Virus Res.* 2016;211(4):58-63. DOI 10.1016/j.virusres.2015.09.022.
- Vainio E.J., Chiba S., Ghabrial S.A., Maiss E., Roossinck M., Sabanadzovic S., Suzuki N., Xie J., Nibert M. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Partitiviridae*. *J. Gen. Virol.* 2018;99(1):17-18. DOI 10.1099/jgv.0.000985.
- van Leeuwen M., Williams M.M., Koraka P., Simon J.H., Smits S.L., Osterhaus A.D. Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(5):1787-1794. DOI 10.1128/JCM.02452-09.
- Vanopdenbosch E., Wellemans G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. *Vet. Rec.* 1989;125(24):610.
- Verma H., Mor S.K., Erber J., Goyal S.M. Prevalence and complete genome characterization of turkey picobirnaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2015;30:134-139. DOI 10.1016/j.meegid.2014.12.014.
- Wakuda M., Pongsuwanna Y., Taniguchi K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J. Virol. Methods.* 2005;126(1-2):165-169. DOI 10.1016/j.jviromet.2005.02.010.
- Wang Y., Banyai K., Tu X., Jiang B. Simian genogroup I picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:2779-2782. DOI 10.1128/JCM.00634-12.
- Wilburn L., Yodmeeklin A., Kochjan P., Saikruang W., Kumthip K., Khamrin P., Maneekarn N. Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand. *Arch. Virol.* 2016;162(4):1061-1066. DOI 10.1007/s00705-016-3190-3.
- Wille M., Shi M., Klaassen M., Hurt A.C., Holmes E.C. Virome heterogeneity and connectivity in waterfowl and shorebird communities. *ISME J.* 2019;13(10):2603-2616. DOI 10.1038/s41396-019-0458-0.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Bai R., Teng J.L.L., Lee P., Martelli P., Hui S.W., Yuen K.Y. Complete genome sequence of a novel picobirnavirus, otarine picobirnavirus, discovered in California sea lions. *J. Virol.* 2012;86(11):6377-6378. DOI 10.1128/JVI.00686-12.
- Woo P.C.Y., Teng J.L.L., Bai R., Tang Y., Wong A.Y.P., Li K.S.M., Lam C.S.F., Fan R.Y.Y., Lau S.K.P., Yuen K.-Y. Novel picobirnaviruses in respiratory and alimentary tracts of cattle and monkeys with large intra- and inter-host diversity. *Viruses.* 2019;11(6):574. DOI 10.3390/v11060574.
- Yinda C.K., Ghogomu S.M., Conceicao-Neto N., Beller L., Deboutte W., Vanhulle E., Maes P., Van Ranst M., Matthijnsens J. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, gastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018;3(2):vey008. DOI 10.1093/ve/vey008.
- Yinda C.K., Vanhulle E., Conceição-Neto N., Beller L., Deboutte W., Shi C., Ghogomu S.M., Maes P., Van Ranst M., Matthijnsens J. Gut virome analysis of Cameroonians reveals high diversity of enteric viruses, including potential interspecies transmitted viruses. *mSphere.* 2019;4(1):1-22. DOI 10.1128/mSphere.00585-18.
- Zhang B., Tang C., Yue H., Ren Y., Song Z. Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China. *J. Gen. Virol.* 2014;95(7):1603-1611. DOI 10.1099/vir.0.063743-0.
- Zhang S., Bai R., Feng R., Zhang H., Liu L. Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater. *Microb. Biotechnol.* 2015;8(3):474-482. DOI 10.1111/1751-7915.12239.

ORCID ID

A.Yu. Kashnikov orcid.org/0000-0003-1033-7347

N.V. Epifanova orcid.org/0000-0001-7679-8029

N.A. Novikova orcid.org/0000-0002-3710-6648

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.04.2020. После доработки 26.05.2020. Принята к публикации 26.05.2020.


Симбиотические бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* среди тлей (Aphidoidea)

Д.А. Романов^{1, 2}, И.А. Захаров¹, Е.В. Шайкевич^{1, 3} 

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный областной университет, Мытищи, Московская область, Россия

³ Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

 e-mail: elenashaikevich@mail.ru

Аннотация. Тли – разнообразное семейство вредителей сельскохозяйственных культур. Тли сформировали сложную взаимосвязь с внутриклеточными бактериями, известными как эндосимбионты, которые оказывают как положительное, так и отрицательное влияние на хозяина, что может иметь практическое значение. В разных регионах мира состав факультативных симбионтов в популяциях тлей варьирует. Задачей работы было установить распространение и генетическое разнообразие симбионтов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* в тлях, собранных в 2018–2019 гг. в Москве и Подмосковье. Для этого 578 тлей из 32 мест сбора тестировали методом ПЦР, используя специфические праймеры для мтДНК тлей, *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia*. Методом молекулярно-генетического анализа определено не менее 21 вида тлей из 14 родов и четырех семейств. Одиннадцать видов оказались инфицированы эндосимбионтами, а именно: у шести видов обнаружены *Rickettsia*, у двух видов – *Wolbachia*, у одного – *Spiroplasma*. Впервые выявлено заражение бактерией *Rickettsia* у *Impatiens asiaticum*, *Myzus cerasi*, *Hyalopterus pruni*, *Eucallipterus tiliae*, *Chaitophorus tremulae* и бактерией *Wolbachia* у *Aphis pomi* и *C. tremulae*. У половины особей гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* установлено двойное заражение *Rickettsia* и *Spiroplasma*. Впервые выявлены риккетсии у шести видов тлей, которые генетически отличаются от известных ранее. Впервые обнаружено заражение яблонной тли *A. pomi* двумя штаммами *Wolbachia*, причем один из штаммов относится к супергруппе В и генетически близок к *Wolbachia* из осиновой тли *C. tremulae*, а второй штамм относится к супергруппе М, недавно описанной у видов тлей. *Spiroplasma*, найденная нами у *A. pisum*, генетически близка *Spiroplasma*, вызывающей андроцид у тлей, божьих коровок и молей, и кластеризуется с *S. ixodetis*. Разнообразие ДНК симбионтов убедительно свидетельствует о том, что как материнское наследование, так и горизонтальный перенос являются путями распространения факультативных бактерий у тлей. Ключевые слова: тля; эндосимбионты; ПЦР; вредители растений; мутуализм.

Для цитирования: Романов Д.А., Захаров И.А., Шайкевич Е.В. Симбиотические бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* среди тлей (Aphidoidea). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(6):673-682. DOI 10.18699/VJ20.661


Wolbachia, *Spiroplasma*, and *Rickettsia* symbiotic bacteria in aphids (Aphidoidea)

Д.А. Романов^{1, 2}, И.А. Захаров¹, Е.В. Шайкевич^{1, 3} 

¹ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Moscow Region State University, Mytishi, Moscow region, Russia

³ Institute of Medical Parasitology and Tropical Medicine named after E. Martinsonskii, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

 e-mail: elenashaikevich@mail.ru

Abstract. Aphids are a diverse family of crop pests. Aphids formed a complex relationship with intracellular bacteria. Depending on the region of study, the species composition of both aphids and their facultative endosymbionts varies. The aim of the work was to determine the occurrence and genetic diversity of *Wolbachia*, *Spiroplasma* and *Rickettsia* symbionts in aphids collected in 2018–2019 in Moscow. For these purposes, 578 aphids from 32 collection sites were tested by PCR using specific primers. At least 21 species of aphids from 14 genera and four families were identified by barcoding method, of which 11 species were infected with endosymbionts. *Rickettsia* was found in six species, *Wolbachia* in two species, *Spiroplasma* in one species. The presence of *Rickettsia* in *Impatiens asiaticum*, *Myzus cerasi*, *Hyalopterus pruni*, *Eucallipterus tiliae*, *Chaitophorus tremulae* and *Wolbachia* in *Aphis pomi* and *C. tremulae* has been described for the first time. A double infection with *Rickettsia* and *Spiroplasma* was detected in a half of pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) individuals. For the first time was found that six species of aphids are infected with *Rickettsia* that are genetically different from previously known. It was first discovered that *A. pomi* is infected with two *Wolbachia* strains, one of which belongs to supergroup B and is genetically close to *Wolbachia* from *C. tremulae*. The second *Wolbachia* strain from *A. pomi* belongs to the supergroup M, recently described in aphid species. *Spiroplasma*, which we

observed in *A. pisum*, is genetically close to male killing *Spiroplasma* from aphids, ladybirds and moths. Both maternal inheritance and horizontal transmission are the pathways for the distribution of facultative endosymbiotic bacteria in aphids.

Key words: aphids; endosymbionts; PCR; plant pests; mutualism.

For citation: Romanov D.A., Zakharov I.A., Shaikovich E.V. *Wolbachia*, *Spiroplasma*, and *Rickettsia* symbiotic bacteria in aphids (Aphidoidea). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):673-682. DOI 10.18699/VJ20.661

Введение

Тли (Hemiptera: Aphidoidea) – надсемейство насекомых из отряда полужесткокрылых, включающее около 10 семейств или подсемейств и 5000 видов. Тли распространены повсеместно, вредят растениям, питаются их соком, и являются переносчиками не менее 30 % видов вирусов растений (Augustinos et al., 2011). Для тлей характерна сложная взаимосвязь с внутриклеточными бактериями, известными как эндосимбионты. Облигатный мутуалистический симбиоз тлей с *Buchnera aphidicola* обеспечивает насекомое-хозяина незаменимыми аминокислотами, отсутствующими в растительных соках (Douglas, 1998). Кроме того, у тлей известны девять видов факультативных симбионтов (Guo et al., 2017), которые сосуществуют с *Buchnera* и оказывают как положительное, так и отрицательное влияние на хозяина.

В зависимости от вида факультативные внутриклеточные симбиотические бактерии могут повышать устойчивость тлей к тепловому шоку, к паразитоидным осам, грибковым инфекциям, участвовать в выработке необходимых для хозяина питательных веществ совместно с облигатным симбионтом, а также способствовать взаимодействию тлей с растением, на котором те питаются (Guo et al., 2017). В то же время было показано, что бактерии рода *Rickettsia* негативно влияют на приспособленность гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* и подавляют деятельность *Buchnera aphidicola* (Sakurai et al., 2005). Бактерии рода *Spiroplasma* уменьшали продолжительность жизни у *A. pisum* и размножение тлей (Simon et al., 2007, 2011), хотя и обладали (слабым) защитным эффектом против осы-паразитоида *Aphidius ervi* (Mathé-Hubert et al., 2019). Роль *Wolbachia* в жизнедеятельности тлей до конца не ясна (De Clerck et al., 2015; Manzano-Marín, 2019). Однако у азиатских цитрусовых псиллид *Diaphorina citri* эндосимбионт *Wolbachia* репрессирует холиновый промотор альфапротеобактерии “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, вызывающей заболевание цитрусовых, что приводит к гибели бактерий и тем самым предотвращает распространение заболевания (Jain et al., 2017).

В настоящей статье изучаются факультативные эндосимбионты тлей *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia*. *Wolbachia* – наиболее распространенный вид симбиотических бактерий среди насекомых, и тли не являются исключением. Зараженность *Wolbachia* обнаружена у 82 видов тлей (Zytynska, Weisser, 2016). У *A. pisum* встречаются два вида симбионтов – *Rickettsia* (Sakurai et al., 2005) и *Spiroplasma* (Fukatsu et al., 2001). Оба вида, *Spiroplasma* и *Rickettsia*, найдены также у тли коровьего гороха (вины китайской) *Aphis craccivora* (Brady et al., 2014) и у свекловичной (или бобовой) тли *Aphis fabae* (Zytynska et al., 2016). *Spiroplasma* обнаружена у тропических тлей –

цитрусовой *Aphis citricidus* и полифага *Aphis aurantii* (Guidolin, Cònsoli, 2018). *Rickettsia* найдена у тли ежевики *Amphorophora rubi* (Haynes et al., 2003) и бахчевой (или хлопковой) тли *Aphis gossypii* (Jones et al., 2011). В разных регионах мира состав симбионтов в популяциях тлей варьирует (Augustinos et al., 2011; Zytynska, Weisser, 2016; Guo et al., 2017; Guidolin, Cònsoli, 2018). В России, в Саратовской области среди факультативных симбионтов тлей бактерии *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* не были выявлены (Мальшина и др., 2014).

Исследование зараженности тлей симбионтами имеет практическое значение, так как позволяет приблизиться к созданию новых стратегий борьбы, блокирующих передачу патогенов растений (Heck, 2018). В зависимости от типа симбионта информация о зараженности может использоваться для вылечивания от симбионта или для трансинфекции определенным штаммом бактерии с целью уменьшения способности переносчика к передаче патогенов.

Задачей работы было установить распространение и генетическое разнообразие симбионтов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* в выборках тлей в г. Москве, а также в городах Звенигороде и Люберцах Московской области. Для этого 578 тлей из 32 мест сбора тестировали методом ПЦР, используя специфические праймеры для *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia*. Систематическое положение хозяев-тлей и их симбионтов установили, определив нуклеотидные последовательности генов тлей и бактерий.

Материалы и методы

Сбор тлей проводили в июле–сентябре 2018 г. и в мае 2019 г. в Москве, Звенигороде и Люберцах (табл. 1). Были собраны 32 выборки тлей на 17 видах растений. Собранные имаго тлей фиксировались в 96 % этаноле.

Выделение тотальной ДНК из индивидуальных особей осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Реакции амплификации проводили в объеме 25 мкл с использованием универсального набора Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Москва) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Все реакции выполнялись на термоциклере MiniAmp Plus (Applied Biosystems). Идентификацию видов тлей выполняли методом ПЦР с использованием универсальных праймеров LCO1490 и HCO2198, комплементарных 5'-концу гена цитохромоксидазы I (*COI*) мтДНК, как описано ранее (Folmer et al., 1994).

При выявлении симбионтов использовали специфические праймеры: RicF141 и RicR548 для гена *gltA* *Rickettsia* (Goryacheva et al., 2017), *spi_f1* и *spi_r3* для 16S рПНК *Spiroplasma* (Sanada-Morimura et al., 2013), *ftsZ-F1* и *ftsZ-R1* для гена *ftsZ* *Wolbachia* (Baldo et al., 2006).

Таблица 1. Виды тлей и растений, дата и место сбора

Вид тли	Место сбора	Время сбора	Вид растения
<i>Acyrtosiphon caraganae</i> , тля акациевая большая	Люберцы, Октябрьский пр-т, 55°41'37" с. ш., 37°51'55" в. д.	Май 2019	<i>Caragana arborescens</i> , карагана древовидная
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , тля гороховая	Звенигород, биостанция МГУ, 55°41'59" с. ш., 36°43'19" в. д.	Июль 2018	<i>Pisum sativum</i> , горох посевной
<i>Anoesia</i> sp., тля свидинно-злаковая	(1) Москва, Нескучный сад, 55°42'46" с. ш., 37°35'02" в. д.	Сентябрь 2019	<i>Cornus alba</i> , дерен белый
	(2) Москва, Нескучный сад, 55°42'51" с. ш., 37°35'14" в. д.		<i>Cornus sanguinea</i> , дерен кроваво-красный
<i>Anuraphis subterranea</i> , тля грушево-зонтичная бурая	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'22" с. ш., 37°51'34" в. д.	Май 2019	<i>Pyrus calleryana</i> , груша декоративная
<i>Aphis fabae</i> , тля свекловичная	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'15" с. ш., 37°51'27" в. д.	Май 2019	<i>Philadelphus</i> sp., чубушник
<i>Aphis pomi</i> , тля яблонная зеленая	(1) Москва, ул. Академика Хохлова, 55°42'17" с. ш., 37°31'30" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
	(2) Москва, ул. Солнечная, 55°35'25" с. ш., 37°22'03" в. д.		<i>Cotoneaster</i> sp., кизильник
	(3) Москва, ул. Ферсмана, 55°41'37" с. ш., 37°34'15" в. д.		
<i>Chaitophorus tremulae</i> , тля осиновая	Москва, ул. Солнечная, 55°35'13" с. ш., 37°22'20" в. д.	Май 2019	<i>Populus tremula</i> , осина обыкновенная
<i>Corylobium avellanae</i> , тля лещинная	Москва, ул. Губкина, 55°41'49" с. ш., 37°33'54" в. д.	Май 2019	<i>Corylus avellana</i> , лещина обыкновенная
<i>Dysaphis</i> sp.	Москва, ул. Академика Хохлова, 55°42'15" с. ш., 37°31'32" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
<i>Dysaphis affinis</i> , тля яблонево-полосатая	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'22" с. ш., 37°51'34" в. д.	Май 2019	<i>Pyrus calleryana</i> , груша декоративная
<i>Dysaphis devecta</i> , тля яблонево-серая	Москва, ул. Академика Хохлова, 55°42'19" с. ш., 37°31'26" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
<i>Dysaphis plantaginea</i> , тля яблонно-подорожниковая	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'18" с. ш., 37°51'24" в. д.	Май 2019	<i>Malus domestica</i> , яблоня домашняя
<i>Eucallipterus tiliae</i> , тля липовая	Москва, ул. Губкина, 55°41'45" с. ш., 37°33'52" в. д.	Май 2019	<i>Tilia</i> sp., липа
<i>Hyalopterus pruni</i> , тля тростниковая	Москва, ул. Мытная, 55°42'46" с. ш., 37°37'16" в. д.	Май 2019	<i>Prunus cerasus</i> , вишня обыкновенная
<i>Huperomyzus lactucae</i> , тля салатная	Люберцы, Октябрьский пр-т, 55°41'38" с. ш., 37°51'55" в. д.	Май 2019	<i>Ribes nigrum</i> , смородина черная
<i>Impatiens asiaticum</i> , тля бальзаминная азиатская	(1) Москва, Царицыно, 55°36'35" с. ш., 37°40'43" в. д.	Сентябрь 2018	<i>Impatiens parviflora</i> , недотрога мелкоцветковая
	(2) Москва, Коломенское, 55°40'20" с. ш., 37°41'02" в. д.		
	(3) Москва, Коломенское, 55°39'51" с. ш., 37°40'05" в. д.		
	(4) Москва, Нескучный сад, 55°42'48" с. ш., 37°35'11" в. д.		
	(5) Москва, Леоновская роща, 55°50'30" с. ш., 37°38'04" в. д.		
<i>Macrosiphum rosae</i> , тля розанная зеленая	Москва, ул. Шухова, 55°43'00" с. ш., 37°36'54" в. д.	Май 2019	<i>Rosa</i> sp., шиповник
<i>Myzus cerasi</i> , тля вишневая	(1) Москва, ул. Губкина, 55°41'40" с. ш., 37°34'00" в. д.	Май 2019	<i>Prunus cerasus</i> , вишня обыкновенная
	(2) Москва, ул. Мытная, 55°42'45" с. ш., 37°37'17" в. д.		
<i>Rhopalosiphum loniceriae</i> , тля злаково-жимолостная	Москва, ул. Генерала Кузнецова, 55°41'25" с. ш., 37°51'36" в. д.	Май 2019	<i>Lonicera tatarica</i> , жимолость татарская
<i>Rhopalosiphum padi</i> , тля черемуховая обыкновенная	(1) Москва, ИБР, теплица, 55°42'03" с. ш., 37°34'35" в. д.	Сентябрь 2018	<i>Triticum</i> sp., пшеница
	(2) Москва, ул. Саранская, 55°41'31" с. ш., 37°51'25" в. д.	Май 2019	<i>Prunus padis</i> , черемуха обыкновенная
	(3) Москва, ул. Ферсмана, 55°41'36" с. ш., 37°34'12" в. д.		
<i>Schizaphis graminum</i> , тля злаковая обыкновенная	(1) Москва, ИБР, теплица, 55°42'03" с. ш., 37°34'35" в. д.	Сентябрь 2018	<i>Triticum</i> sp., пшеница
	(2) Москва, ИОГен, теплица, 55°41'47" с. ш., 37°33'53" в. д.	Май 2019	

Условия амплификации: начальная денатурация – 4 мин 30 с при 94 °С, после которой следовало 36 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 59 °С (для *spi_f1* и *spi_r3* – при 53 °С; для *ftsZ* – при 56 °С) и элонгация – 40 с (для *spi_f1* и *spi_r3* – 1 мин) при 72 °С. ПЦР завершалась заключительной элонгацией в течение 5 мин при 72 °С.

Результаты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1.5 % агарозном геле. Элюция фрагментов из геля проводилась с использованием набора для выделения ДНК из агарозных гелей Cleanup Mini («Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Секвенирование очищенных ПЦР-продуктов выполнялось в компании «Евроген». Вновь полученные последовательности гена *COI* зарегистрированы в GenBank под номерами MT302332–MT302357, *gltA Rickettsia* – MT302358–MT302364, *ftsZ Wolbachia* – MT302365–MT302368, 16S *Spiroplasma* – MT302369.

Хроматограммы сиквенсов анализировали с помощью комплекта программ DNASTAR Lasergene 6 (Clewley, 1995; Burland, 2000). Для сравнения полученных нами сиквенсов с уже известными использовали базы данных Barcode of Life Database (Bold) (<http://www.barcodinglife.com/>) и GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). При построении дендрограмм применяли метод присоединения соседей, эволюционную модель Кимуры, бутстреп-поддержку 1000 реплик в программе MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Для последовательностей ДНК на дендрограммах справа от названия изолята приведены

регистрационные номера GenBank и PubMLST для *Wolbachia*. Расчет дивергенции между нуклеотидными последовательностями гена проводили, основываясь на значениях *p*-дистанции (число нуклеотидных различий на сайт), с помощью программы MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

Результаты

Разнообразие видов тлей

Для идентификации видов тлей был применен метод штрихкодирования (Barcoding). Используя нуклеотидные последовательности фрагментов митохондриального гена *COI*, в 32 выборках мы идентифицировали не менее 21 вида тлей; 19 из них удалось определить до вида, а тлей из двух выборок – до рода: *Dysaphis* sp. с яблони (*Malus domestica*) и *Anoecia* sp. с дерена белого (*Cornus alba*) и дерена кроваво-красного (*C. sanguinea*). Наибольшее сходство обнаружено с видами тлей *Dysaphis apiifolia* (97 %) и *Anoecia fulviabdominalis* (96 %). Собранные тли относятся к четырем семействам: Anoeciidae, Callaphididae, Chaitophoridae и Aphididae (рис. 1). Значения эволюционной дивергенции между родами тлей составляют 6–16 %, между видами рода *Dysaphis* – 0.8–6.6 %, между видами рода *Aphis* – 6.3 %. По два гаплотипа мтДНК обнаружены у трех видов: *Aphis pomi*, *Chaitophorus tremulae*, *A. pisum* (см. рис. 1). Различия между гаплотипами по гену *COI* составляют у *A. pomi* 0.2 %, у *C. tremulae* – 0.6 % и *A. pisum* – 0.16 %.

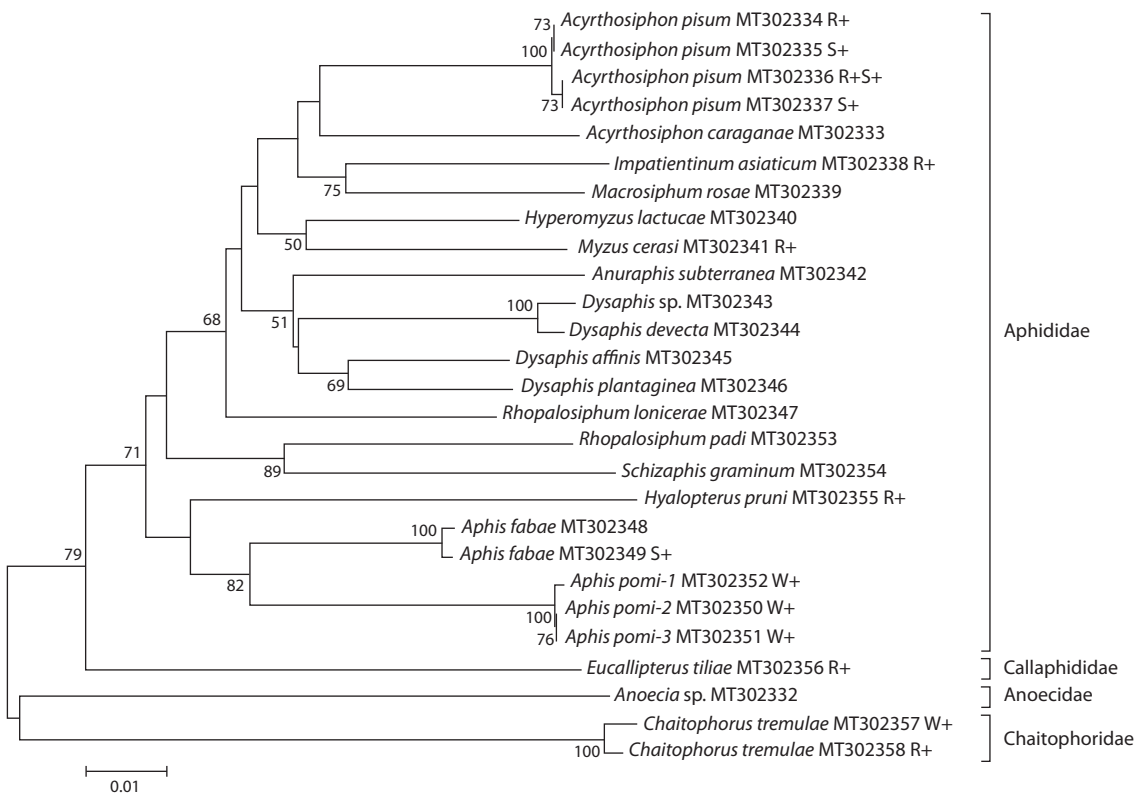


Рис. 1. Филогенетическая реконструкция видового разнообразия тлей по данным анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI* длиной 630 п. н.

Зараженные *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* особи обозначены как W+, R+, S+ соответственно.

Таблица 2. Частота зараженности тлей симбионтами

Вид тли	Кол-во проверенных особей	Вид симбионта и число зараженных		
		<i>Spiroplasma</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Wolbachia</i>
<i>Acyrtosiphon caraganae</i>	20	0	0	0
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	28	24	17	0
<i>Anoecia</i> sp. (1)	17	0	0	0
<i>Anoecia</i> sp. (2)	12	0	0	0
<i>Anuraphis subterranea</i>	11	0	0	0
<i>Aphis fabae</i>	40	0	0	0
<i>Aphis pomi</i> (1)	11	0	0	11
<i>Aphis pomi</i> (2)	36	0	0	36
<i>Aphis pomi</i> (3)	26	0	0	26
<i>Chaitophorus tremulae</i>	9	0	3	2
<i>Corylobium avellanae</i>	10	0	0	0
<i>Dysaphis</i> sp.	9	0	0	0
<i>Dysaphis affinis</i>	9	0	0	0
<i>Dysaphis devectora</i>	10	0	0	0
<i>Dysaphis plantaginea</i>	30	0	0	0
<i>Eucallipterus tiliae</i>	16	0	5	0
<i>Hyalopterus pruni</i>	10	0	10	0
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	18	0	0	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (1)	18	0	11	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (2)	18	0	8	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (3)	18	0	14	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (4)	18	0	8	0
<i>Impatientinum asiaticum</i> (5)	18	0	7	0
<i>Macrosiphum rosae</i>	27	0	0	0
<i>Myzus cerasi</i> (1)	8	0	1	0
<i>Myzus cerasi</i> (2)	23	0	0	0
<i>Rhopalosiphum loniceriae</i>	12	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i> (1)	30	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i> (2)	12	0	0	0
<i>Rhopalosiphum padi</i> (3)	6	0	0	0
<i>Schizaphis graminum</i> (1)	18	0	0	0
<i>Schizaphis graminum</i> (2)	30	0	0	0
Всего (%)	578 (100 %)	24 (4 %)	84 (14 %)	75 (13 %)

Яблонная тля (*A. pomi*), черемуховая (*Rhopalosiphum padi*), вишневая (*Myzus cerasi*) и бальзаминовая (*Impatientinum asiaticum*) обнаружены в двух и более местах сбора (см. табл. 1). По два вида тлей найдены на одном виде растений: *Hyalopterus pruni* и *M. cerasi* – на вишнях, *A. pomi* и *Dysaphis devectora* – на яблонях, *Anuraphis subterranea* и *Dysaphis affinis* – на груше, причем последние два вида тлей сосуществовали на листьях одного и того же дерева (см. табл. 1). Один вид тли на разных видах растений встретился нам дважды: *R. padi* на черемухе и пшенице и *A. pomi* на яблоне и кизильнике.

Зараженность симбиотическими бактериями

Проанализировав наличие *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* у 578 особей 21 вида тлей, мы обнаружили заражение у *A. pisum* (*Spiroplasma* и *Rickettsia*), *I. asiaticum*,

M. cerasi, *H. pruni*, *Eucallipterus tiliae* (*Rickettsia*), *A. pomi* (*Wolbachia*) и *Chaitophorus tremulae* (*Rickettsia* и *Wolbachia*) (табл. 2). У *C. tremulae* особи, зараженные *Rickettsia* и *Wolbachia*, обладают различающимися гаплотипами мтДНК (см. рис. 1).

Rickettsia обнаружены у шести видов, суммарно у 84 особей тлей, *Wolbachia* – у двух видов и 75 особей, *Spiroplasma* – у 24 особей одного вида (см. табл. 2). Как правило, отдельные особи тлей заражены симбиотическими бактериями только одного из трех видов. Однако у *A. pisum* обнаружен факт двойного заражения *Rickettsia* и *Spiroplasma* у 13 из 28 индивидуальных особей. Все имаго *A. pisum* (100 %) были заражены эндосимбионтами одного или двух видов. Наличие *Rickettsia* у *I. asiaticum*, *M. cerasi*, *H. pruni*, *E. tiliae*, *C. tremulae* и *Wolbachia* у *A. pomi* и *C. tremulae* описано впервые.

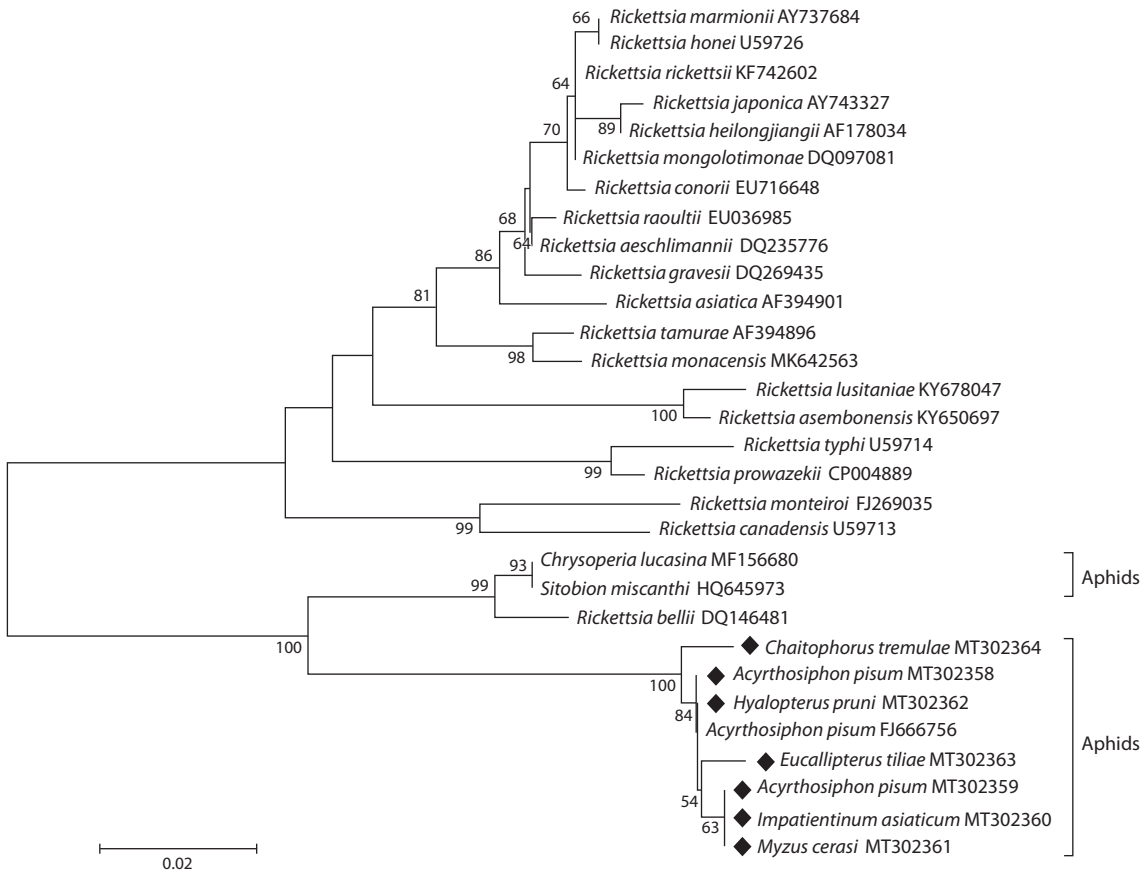


Рис. 2. Филогенетическая реконструкция разнообразия *Rickettsia* по данным анализа нуклеотидных последовательностей гена *gltA* длиной 343 п. н.

Бактерии тлей обозначены по виду хозяина. Бактериальные изоляты, последовательности которых получены в данной работе, выделены ромбами.

Бактерии рода *Rickettsia*. *Rickettsia* тлей кластеризуются с бактериями группы *R. bellii* (рис. 2). У *E. tiliae* и *C. tremulae* аллели гена *gltA* видоспецифичны. У *Rickettsia* из *A. pisum* обнаружено две аллели гена, *gltA*¹ и *gltA*² (номера GenBank MT302358 и MT302359), различающиеся одной нуклеотидной заменой. Аллель *gltA*¹ встретила у одной особи, тогда как аллель *gltA*² – у семи особей *A. pisum*. Аллель *gltA*¹ выявлена также у *Rickettsia* из *H. pruni*, а аллель *gltA*² – у *Rickettsia* из *I. asiaticum* и *M. cerasi*. Аллель *gltA*¹ идентична ДНК *Rickettsia* из *A. pisum* штамма PAR (США), зарегистрированной в Генбанке под номером FJ666756 (см. рис. 2). Аллель *gltA*² выявлена впервые. Значительно различаются полученные нами последовательности ДНК *Rickettsia* от ДНК бактерии из тли *Sitobion miscanthi* (HQ645973), которая генетически близка к *R. bellii* (см. рис. 2). Значение эволюционной дивергенции между группой *R. bellii* и группой *Rickettsia* из данной работы составляет 8.2 %, что намного превышает значения дивергенции между такими видами, как, например, *R. typhi* и *R. prowazekii* (2 %).

Бактерии рода *Wolbachia*. В филогенетической классификации *Wolbachia* выделены 16 супергрупп (Glowaska et al., 2016). *Wolbachia* из *Aphis pomi* 1 (MT302366) и 3 (MT302367) кластеризуется с бактериями супергруппы М, тогда как *Wolbachia* из *Chaitophorus tremulae*

(MT302365) и *A. pomi* 2 (MT302368) – с бактерией из супергруппы В (рис. 3). Различия по ДНК гена *ftsZ Wolbachia* из *A. pomi* 2 (MT302368) и 1 (MT302366) составляют 14.3 % (67 из 466 п. н.) В то же время аллель гена *ftsZ Wolbachia* из *A. pomi* 2 (MT302368) отличается только тремя заменами (0.6 %, 3 из 469 п. н.) от ДНК *Wolbachia* из осинового тли *Chaitophorus tremulae* (MT302365).

Выборка *A. pomi* с *Wolbachia* группы В собрана на кизильнике, выборки *A. pomi* с *Wolbachia* группы М – на кизильнике и яблоне (см. табл. 1). Расстояние между точками сбора *A. pomi* на растениях одного вида, зараженных разными штаммами *Wolbachia*, составляет более 20 км, а расстояние между точками сбора *A. pomi* на растениях разного вида, но зараженных одинаковым штаммом *Wolbachia*, не превышает 4 км (см. табл. 1).

Бактерии рода *Spiroplasma*. Обнаруженная нами *Spiroplasma* из *A. pisum* кластеризуется с бактериями, найденными у *A. pisum* в Японии (AB048263), Великобритании (JX943566, JX943567) и *A. craccivora* из США (KF362032) (рис. 4). Изменчивость генов 16S рРНК *Spiroplasma* у тлей *A. pisum* из географически удаленных мест составляет 0.3–0.6 % (5–8 нуклеотидных замен на 974 п. н.). Все они входят в кладу *Spiroplasma ixodetis*. В эту же кладу входят симбионты других насекомых, например божьих коровок *Anisosticta novemdecimpunctata* (AM087471) и

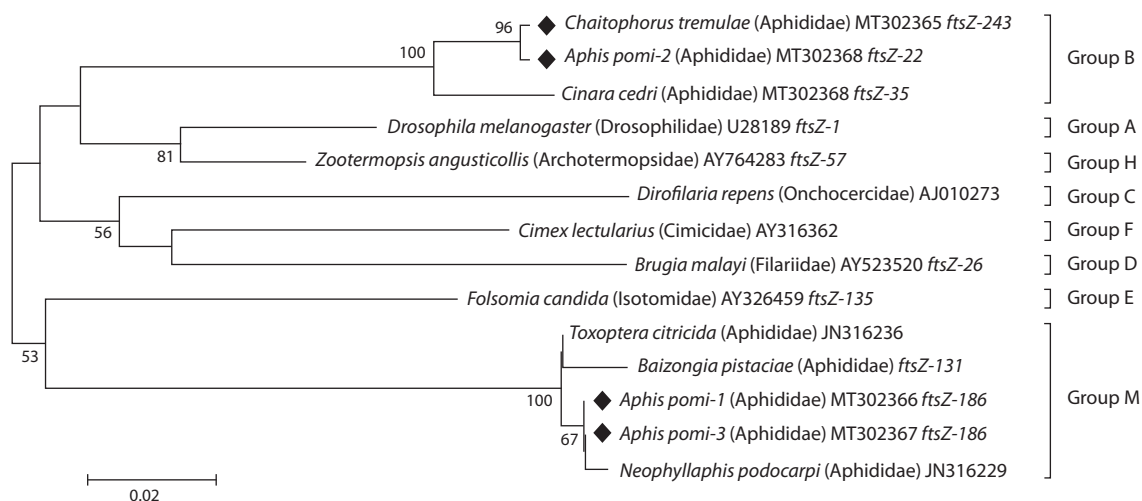


Рис. 3. Филогенетическая реконструкция разнообразия *Wolbachia* по данным анализа нуклеотидных последовательностей гена *ftsZ* длиной 466 п. н.

Супергруппы *Wolbachia* приведены справа. Бактерии обозначены по виду хозяина, в скобках указано семейство хозяина. Бактериальные изоляты, последовательности которых получены в данной работе, выделены ромбами.

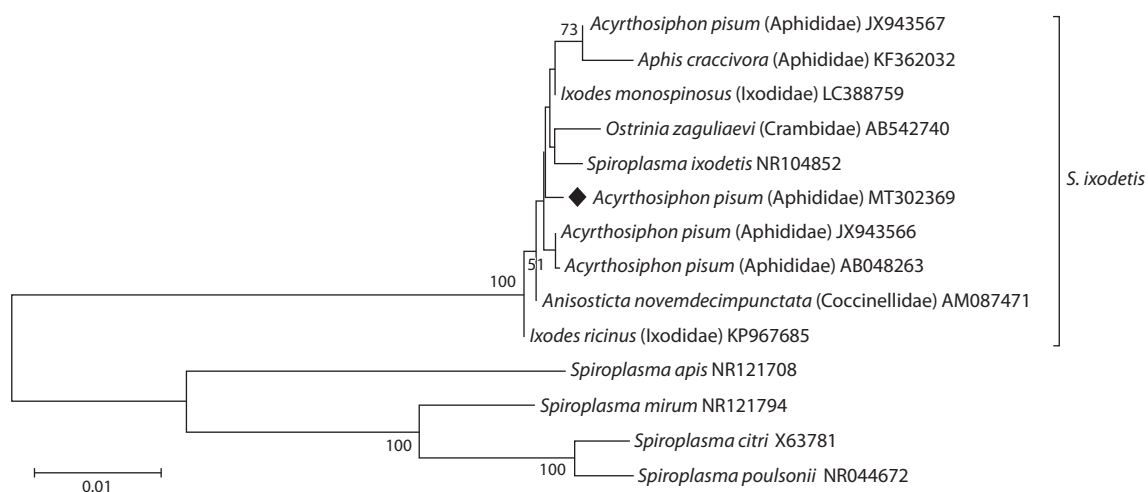


Рис. 4. Филогенетическая реконструкция видового разнообразия *Spiroplasma* по данным анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК длиной 974 п. н.

Бактерии насекомых обозначены по виду хозяина, в скобках указано семейство хозяина. Бактериальный изолят, последовательность которого получена в данной работе, выделен ромбом.

мотыльков *Ostrinia zaguliaevi* (AB542740). Внутри этой клады разнообразие нуклеотидов не превышает 0.6 %. Между кладами рода *Spiroplasma* разнообразие нуклеотидов достигает 10–16 %.

Обсуждение

В данной работе нам удалось показать, что изученные 32 выборки тлей представлены не менее чем 21 видом. Большинство исследованных видов тлей (18 из 21) относится к семейству Aphididae, и присутствует по одному виду из семейств Anoeciidae, Callaphididae и Chaitophoridae. Два вида не приурочены к растению-хозяину, а 19 видов тлей встретились нам только на одном виде растений.

Впервые обнаружено заражение *Rickettsia* у *I. asiaticum*, *M. cerasi*, *H. pruni*, *E. tiliae*, *C. tremulae* и *Wolbachia*

у *A. pomi* и *C. tremulae*. В отличие от других исследований (Zytynska, Weisser, 2016), в наших сборах в Москве виды тлей в основном заражены *Rickettsia*, а не *Wolbachia*. У осинового тли *C. tremulae* особи, зараженные бактериями *Rickettsia* и *Wolbachia*, имеют различающиеся гаплотипы мтДНК. Сохраняется ли совместная передача цитоплазматических компонентов у тлей этого вида, предстоит выяснить на большем количестве образцов. У половины особей гороховой тли *A. pisum* выявлено двойное заражение *Rickettsia* и *Spiroplasma*. Многие исследователи уже отмечали присутствие *Rickettsia* и *Spiroplasma* среди факультативных симбионтов *A. pisum* в Европе (Nyabuga et al., 2010; Ferrari et al., 2012; Gauthier et al., 2015), США (Russell et al., 2013; Smith et al., 2015), Японии (Tsuchida et al., 2002). Зараженность 28 особей *A. pisum* в исследуемой

выборке из г. Звенигорода составила 61 % (*Rickettsia*) и 86 % (*Spiroplasma*), что в несколько раз превышает опубликованные ранее показатели: 8 и 3 % в 119 изосамочных линиях из 81 популяции в Японии (Tsuchida et al., 2002), 48 и 9 % среди 318 особей в США (Russell et al., 2013), 4 и 22 % в 30 линиях (Nyabuga et al., 2010), 23 и 27 % в выборках с восьми видов бобовых растений из Англии и Германии (Ferrari et al., 2012). Возможно, такая высокая зараженность бактериями существует непродолжительное время, поскольку и *Spiroplasma*, и *Rickettsia* снижают продолжительность жизни тлей и их плодовитость (Simon et al., 2007, 2011; Mathé-Hubert et al., 2019). Согласно нашим предыдущим наблюдениям, при длительном лабораторном культивировании *A. pisum* симбиотические бактерии *Spiroplasma* утрачивались.

Rickettsia тлей в наших сборах формируют отдельный кластер. Ранее было показано, что *Rickettsia* из *A. pisum* на основе сравнения четырех генов бактерии относится к группе *R. bellii* (Weinert et al., 2009). Необходимо исследование других генов бактерии у разных видов тлей, для того чтобы установить, являются ли они отдельным видом рода *Rickettsia*. Группа бактерий *R. bellii* представляют собой базальную группу риккетсий, которая сформировалась ранее *Rickettsia* группы патогенной пятнистой лихорадки и группы сыпного тифа (Stothard et al., 1994). Четыре генетически различающиеся аллели гена *gltA* *Rickettsia* обнаружены у изученных шести видов тлей, причем две из них встретились у *A. pisum*. Одна аллель (MT302359) встретилась нам у представителей трех родов тлей, другая (MT302358) – у двух родов, и оставшиеся два вида обладают уникальными аллельными вариантами симбионта. Это позволяет предположить, что заражение *Rickettsia* у разных видов тлей происходило независимым образом.

Spiroplasma, выделенная у *A. pisum* на основе анализа ДНК гена 16S рРНК, кластеризуется с бактериями, найденными ранее у *A. pisum* и *A. craccivora*. Было показано, что у *A. pisum* *Spiroplasma* вызывают смерть потомства мужского пола на ранних личиночных стадиях – так называемый андроцид, или male killing (Simon et al., 2011), и генетически они близки *Spiroplasma*, вызывающим андроцид у хищников тлей – божьих коровок (Tinsley, Majerus, 2006) и мотыльков (Tabata et al., 2011). Все эти бактерии относятся к группе *Spiroplasma ixodetis*. Бактерия *S. ixodetis* является эндосимбионтом, который описан у клещей, но широко распространен и среди других членистоногих. Филогенетические исследования показали, что штаммы *S. ixodetis* неоднократно подвергались горизонтальным переносам между клещами и другими членистоногими, включая тлю (Binetruy et al., 2019).

Мы впервые обнаружили зараженность *Wolbachia* у яблонной тли *A. pomi*. Этот симбионт встречается у 100 % особей *A. pomi* в наших сборах, тогда как ранее у тлей данного вида из Греции он не выявлялся (Augustinos et al., 2011). Яблонная тля *A. pomi* из трех мест сбора в Москве (см. 1–3 в табл. 1) инфицирована двумя штаммами *Wolbachia*, один из которых относится к супергруппе В, а другой – к супергруппе М (см. рис. 3). Супергруппа М недавно описана у видов тлей в Испании, Португалии, Греции, Израиле и Иране (Augustinos et al., 2011), Китае (Wang et al., 2014) и на Азорских островах (Moreira et al.,

2019). Во всех работах в исследованных сборах тлей преобладали *Wolbachia* супергруппы М. На основе данных о низкой генетической изменчивости *Wolbachia* супергруппы М предполагается ее недавнее появление и быстрое распространение по популяциям тлей (Wang et al., 2014).

Наши результаты позволяют предположить, что зараженность *A. pomi* определенным штаммом *Wolbachia* связана не с видом растения-хозяина тли, а с местом произрастания растений. Интересный факт обнаружения мало различающихся аллельных вариантов гена *ftsZ* *Wolbachia* у тлей разных видов (*A. pomi* и *C. tremulae*) может указывать на возможность обмена генами бактерии при горизонтальных переносах *Wolbachia* среди насекомых, например, через паразитов или через растения. В пользу этой гипотезы говорит находка близкородственных аллелей генов *Wolbachia* у других неродственных насекомых (Pinsky, Kosterin, 2017; Shaikovich et al., 2019). Разнообразие ДНК симбионтов убедительно свидетельствует о том, что как материнское наследование, так и горизонтальные переносы являются основными путями распространения факультативных бактерий у тлей.

Заключение

Понимание роли симбионтов тлей постепенно растет благодаря данным лабораторных исследований, однако информации о распространении симбионтов в популяциях тлей в природных экосистемах пока недостаточно. Наши результаты представляют собой первое сообщение о генетическом разнообразии бактериальных эндосимбионтов у видов тлей, которые ранее не подвергались изучению. В результате скрининга популяций тлей в г. Москве и Московской области впервые выявлено заражение шести видов тлей риккетсиями, генетически отличающимися от *R. bellii*, к которой принято относить симбионтов тлей (Weinert et al., 2009). Вопрос о выделении этих бактерий в новый вид можно будет решить, исследуя большее число аллелей *Rickettsia*. Впервые обнаружено заражение яблонной тли *A. pomi* двумя штаммами *Wolbachia*, причем один из штаммов относится к супергруппе В и генетически близок с *Wolbachia* из осинового тли, а второй штамм относится к супергруппе М. Вне зависимости от штамма, 100 % исследованных нами особей *A. pomi* заражены *Wolbachia*, и можно предположить существование отбора инфицированных особей за счет репродуктивных манипуляций, обнаруженных у *Spiroplasma* из *A. pisum* (Simon et al., 2011). Однако большинство поколений тлей бесполое, и если репродуктивные эффекты поддерживают зараженность симбионтами в естественных популяциях тлей, то такой репродуктивный фенотип должен быть очень полезным для насекомого-хозяина. Очевидным преимуществом андроцида является избегание инбридинга в популяции тлей (Simon et al., 2011). Достаточно ли этих преимуществ, чтобы компенсировать возможные издержки инфекции симбионтами во время бесполой фазы жизненного цикла, не ясно. По-видимому, положительное влияние, такое как предоставление устойчивости к естественным врагам (паразитоиды, патогенные грибы, тепловой стресс), служит ключевым фактором увеличения частоты факультативных эндосимбионтов *Wolbachia*, *Spiroplasma* и *Rickettsia* в популяции тлей.

Список литературы / References

- Малышина М.С., Петерсон А.М., Глинская Е.В. Эколого-физиологические аспекты формирования микробценозов тлей (Hemiptera: Aphididae), паразитирующих на древесных и кустарниковых растениях в Саратовской области. *Тр. Рус. энтомот. о-ва*. 2014;85(2):40-46.
[Malysheina M.S., Peterson A.M., Glinskaya E.V. Ecological and physiological aspects of the formation of microbial cenoses in aphids (Hemiptera: Aphididae) feeding on woody and shrubby plants in Saratov oblast. *Trudy Russkogo Entomologicheskogo Obshchestva = Proceedings of the Russian Entomological Society*. 2014;85(2):40-46. (in Russian)]
- Augustinos A.A., Santos-Garcia D., Dionyssopoulou E., Moreira M., Papapanagiotou A., Scarvelakis M., Doudoumis V., Ramos S., Aguiar A.F., Borges P.A.V., Khadem M., Latorre A., Tsiamis G., Bourtzis K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS One*. 2011;6(12):e28695. DOI 10.1371/journal.pone.0028695.
- Baldo L., Dunning Hotopp J.C., Jolley K.A., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Maiden M.C., Tettelin H., Werren J.H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(11):7098-7110. DOI 10.1128/AEM.00731-06.
- Binetruy F., Bailly X., Chevillon C., Martin O.Y., Bernasconi M.V., Duron O. Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2019;10:575-584.
- Brady C.M., Asplen M.K., Desneux N., Heimpel G.E., Hopper K.R., Linnen C.R., Oliver K.M., Wulff J.A., White J.A. Worldwide populations of the aphid *Aphis craccivora* are infected with diverse facultative bacterial symbionts. *Microb. Ecol.* 2014;67:195-204. DOI 10.1007/s00248-013-0314-0.
- Burland T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:71-91.
- Clewley J.P. Macintosh sequence analysis software. DNASTAR's LaserGene. *Mol. Biotechnol.* 1995;3:221-224.
- De Clerck C., Fujiwara A., Joncour P., Léonard S., Félix M.L., Francis F., Jijakli M.H., Tsuchida T., Massart S. A metagenomic approach from aphid's hemolymph sheds light on the potential roles of co-existing endosymbionts. *Microbiome*. 2015;3:63. DOI 10.1186/s40168-015-0130-5.
- Douglas A. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.* 1998;43:17-37.
- Ferrari J., West J.A., Via S., Godfray H.C. Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex. *Evolution*. 2012;66(2):375-390. DOI 10.1111/j.1558-5646.2011.01436.x.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994;3:294-299.
- Fukatsu T., Tsuchida T., Nikoh N., Koga R. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67(3):1284-1291. DOI 10.1128/AEM.67.3.1284-1291.2001.
- Gauthier J.-P., Outreman Y., Miezuet L., Simon J.-C. Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120664. DOI 10.1371/journal.pone.0120664.
- Glowska E., Dragun-Damian A., Dabert M., Gerth M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infect. Genet. Evol.* 2016;30:140-146.
- Goryacheva I., Blekhman A., Andrianov B., Zakharov I.A. Heritable bacterial endosymbionts in native and invasive populations of *Harmonia axyridis*. *Biol. Invasions*. 2017;19:493-502. DOI 10.1007/s10530-016-1298-8.
- Guidolin A.S., Cònsoli F.L. Diversity of the most commonly reported facultative symbionts in two closely-related aphids with different host ranges. *Neotrop. Entomol.* 2018;47(4):440-446. DOI 10.1007/s13744-017-0532-0.
- Guo J., Hatt S., He K., Chen J., Francis F., Wang Z. Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *J. Asia-Pac. Entomol.* 2017;20:794-801. DOI 10.1016/j.aspen.2017.03.025.
- Haynes S., Darby A.C., Daniell T.J., Webster G., Van Veen F.J., Godfray H.C., Prosser J.I., Douglas A.E. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(12):7216-7223. DOI 10.1128/aem.69.12.7216-7223.2003.
- Heck M. Insect transmission of plant pathogens: a systems biology perspective. *mSystems*. 2018;3(2):e00168-17. DOI 10.1128/mSystems.00168-17.
- Ilinsky Y., Kosterin O.E. Molecular diversity of *Wolbachia* in Lepidoptera: prevalent allelic content and high recombination of MLST genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017;109:164-179. DOI 10.1016/j.ympev.2016.12.034.
- Jain M., Fleites L.A., Gabriel D.W. A small *Wolbachia* protein directly represses phage lytic cycle genes in "Candidatus *Liberibacter asiaticus*" within psyllids. *mSphere*. 2017;2(3):e00171-17. DOI 10.1128/mSphereDirect.00171-17.
- Jones R.T., Bressan A., Greenwell A.M., Fierer N. Bacterial communities of two parthenogenetic aphid species cocolonizing two host plants across the Hawaiian Islands. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(23):8345-8349. DOI 10.1128/AEM.05974-11.
- Manzano-Marín A. No evidence for *Wolbachia* as a nutritional co-obligate endosymbiont in the aphid *Pentalonia nigronervosa*. *bioRxiv*. 2019. Preprint doi: 10.1101/609511. Publ. *Microbiome*. 2020;8:72. DOI 10.1186/s40168-020-00865-2.
- Mathé-Hubert H., Kaech H., Ganesanandamoorthy P., Vorburger C. Evolutionary costs and benefits of infection with diverse strains of *Spiroplasma* in pea aphids. *Evolution*. 2019;73(7):1466-1481. DOI 10.1111/evo.13740.
- Moreira M., Aguiar A.M.F., Bourtzis K., Latorre A., Khadem M. *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) infections in isolated aphid populations from Oceanic Islands of the Azores Archipelago: revisiting the supergroups M and N. *Environ. Entomol.* 2019;48(2):326-334. DOI 10.1093/ee/nvy189.
- Nyabuga F.N., Outreman Y., Simon J.-C., Heckel D.G., Weisser W.W. Effects of pea aphid secondary endosymbionts on aphid resistance and development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: a correlative study. *Entomol. Exp. Appl.* 2010;136(3):243-253. DOI 10.1111/j.1570-7458.2010.01021.x.
- Russell J.A., Weldon S., Smith A.H., Kim K.L., Hu Y., Łukasiak P., Doll S., Anastopoulos I., Novin M., Oliver K.M. Uncovering symbiont-driven genetic diversity across North American pea aphids. *Mol. Ecol.* 2013;22(7):2045-2059. DOI 10.1111/mec.12211.
- Sakurai M., Koga R., Tsuchida T., Meng X.-Y., Fukatsu T. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(7):4069-4075. DOI 10.1128/AEM.71.7.4069-4075.2005.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanada-Morimura S., Matsumura M., Noda H. Male killing caused by a *Spiroplasma* symbiont in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J. Hered.* 2013;104(6):821-829. DOI 10.1093/jhered/est052.
- Shaikovich E., Bogacheva A., Rakova V., Ganushkina L., Ilinsky Y. *Wolbachia* symbionts in mosquitoes: intra- and intersubgroup recombinations, horizontal transmission and evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2019;134:24-34. DOI 10.1016/j.ympev.2019.01.020.
- Simon J.-C., Boutin S., Tsuchida T., Koga R., Le Gallie J.F., Frantz A., Outreman Y., Fukatsu T. Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS One*. 2011;6(7):e21831. DOI 10.1371/journal.pone.0021831.
- Simon J.-C., Sakurai M., Bonhomme J., Suchida T., Koga R., Fukatsu T. Elimination of a specialised facultative symbiont does not affect the

- reproductive mode of its aphid host. *Ecol. Entomol.* 2007;32(3): 296-301. DOI 10.1111/j.1365-2311.2007.00868.x.
- Smith A.H., Łukasik P., O'Connor M.P., Lee A., Mayo G., Drott M.T., Doll S., Tuttle R., Disciullo R.A., Messina A., Oliver K.M., Russell J.A. Patterns, causes and consequences of defensive microbiome dynamics across multiple scales. *Mol. Ecol.* 2015;24(5):1135-1149. DOI 10.1111/mec.13095.
- Stothard D.R., Clark J.B., Fuerst P.A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44(4):798-804.
- Tabata J., Hattori Y., Sakamoto H., Yukuhiro F., Fujii T., Kugimiya S., Mochizuki A., Ishikawa Y., Kageyama D. Male killing and incomplete inheritance of a novel *Spiroplasma* in the moth *Ostrinia zugliaevi*. *Microb. Ecol.* 2011;61:254-263. DOI 10.1007/s00248-010-9799-y.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Tinsley M., Majerus M. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology.* 2006;132(6):757-765. DOI 10.1017/S0031182005009789.
- Tsuchida T., Koga R., Shibao H., Matsumoto T., Fukatsu T. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.* 2002;11(10):2123-2135. DOI 10.1046/j.1365-294x.2002.01606.x.
- Wang Z., Su X.-M., Wen J., Jiang Li-Y., Qiao G. Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in Chinese aphids. *Insect Sci.* 2014;21:313-325. DOI 10.1111/1744-7917.12102.
- Weinert L., Werren J., Aebi A., Stone G., Jiggins F. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol.* 2009;7:6. DOI 10.1186/1741-7007-7-6.
- Zytynska S.E., Meyer S.T., Sturm S., Ullmann W., Mehrparvar M., Weisser W.W. Secondary bacterial symbiont community in aphids responds to plant diversity. *Oecologia.* 2016;180(3):735-747. DOI 10.1007/s00442-015-3488-y.
- Zytynska S.E., Weisser W.W. The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. *Ecol. Entomol.* 2016;41:13-26. DOI 10.1111/een.12281.

ORCID ID

D.A. Romanov orcid.org/0000-0003-3340-9278
E.V. Shaikevich orcid.org/0000-0002-6504-5547

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00739. Работа Д.А. Романова по сбору тлей в Звенигороде и Люберцах выполнена в рамках государственного задания по проекту № 0112-2019-0002.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2020. После доработки 01.07.2020. Принята к публикации 03.07.2020.