October 2015 • 19 • 5

Октябрь 2015 • 19 • 5

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Founded in 1997

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/«Vavilov Journal of Genetics and Breeding» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/ "The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists".

«Вавилов**ский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки** России в **Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны** быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (редакция от 25.05.2015 г.: **http://vak.ed.gov.ru/87), Российский** индекс научного цитирования, базу данных Urlich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Электронная версия журнала размещена на:
сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/;
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour;
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440.

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу **«Пресса России».**

© ИЦиГ СО РАН, 2015
© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2015
© Сибирское отделение Российской академии наук, 2015

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

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

Редакционный совет

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); *В.М. Говорун* – чл.-кор. РАН, д-р биол. 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); *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); *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); *К.Г. Скрябин* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *К.В. Славин* – д-р наук, проф. (США); *И.А. Тихонович* – академик РАН, д-р биол. наук (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* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук, доцент (Россия); *Е.Е. Андронов* – канд. биол. наук (Россия); *Ю.С. Аульченко* – д-р биол. наук (Россия); *Д.А. Афонников* – канд. биол. наук, доцент (Россия); *Л.И. Афтанас* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *Е.В. Березиков* – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды); *С.А. Боринская* – д-р биол. наук (Россия); *П.М. Бородин* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.И. Воевода* – чл.-кор. РАМН, д-р мед. наук (Россия); *Т.А. Гавриленко* – д-р биол. наук, доцент (Россия); *В.Н. Даниленко* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *С.А. Демаков* – д-р биол. наук (Россия); *Е.А. Долгих* – канд. биол. наук (Россия); *Н.Н. Дыгало* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *С.Л. Киселев* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *В.А. Козлов* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *Ю.М. Константинов* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *А.В. Кочетов* – д-р биол. наук, доцент (Россия); *О. Кребс* – д-р биол. наук, проф. (Германия); *И.Н. Лаврик* – канд. хим. наук (Германия); *Л.А. Лутова* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *В.Ю. Макеев* – д-р физ.-мат. наук (Россия); *М.П. Мошкин* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *Н.А. Проворов* – д-р биол. наук (Россия); *Д.В. Пышный* – д-р хим. наук, доцент (Россия); *А.В. Ратушный* – канд. биол. наук (США); *Е.А. Салина* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.Г. Самсонова* – д-р биол. наук (Россия); *В.А. Степанов* – д-р биол. наук, проф. (Россия)

e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090. Секретарь по организационным вопросам: С.В. Зубова, тел.: (383) 3634977. Тел. редакции: (383)3634963*5204. Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г. При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна. Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич. Компьютерная графика и верстка: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина. Подписано в печать 27.10.2015 г. Формат бумаги 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 17,0. Усл.-печ. л. 16,27. Тираж 200 экз. Заказ № 243.

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

Содержание Октябрь 2015 • 19 • 5

Нехромосомная наследственность

511 Экспрессия хлоропластного генома: современные представления и экспериментальные пути изучения
М.Г. Синявская, Н.Г. Даниленко, Н.В. Луханина, А.М. Шимкевич, О.Г. Давыденко

529 Определение типа цитоплазмы у растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров
Е.А. Домблидес, А.С. Домблидес, Т.В. Заячковская, Л.Л. Бондарева

538 Влияние типов цитоплазматической мужской стерильности на содержание хлорофилла в листьях гибридов зернового сорго
О.П. Кибальник, Л.А. Эльконин

Молекулярная генетика растений

545 Трансгенные растения как модель для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов
Т.В. Маренкова, Е.В. Дейнеко

552 Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале и пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов трибы Triticeae
О.А. Орловская, И.Н. Леонова, И.Г. Адонина, Е.А. Салина, Л.В. Хотылева, В.К. Шумный

Физиологическая и биохимическая генетика растений

561 Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений
В.Ф. Аджиева, О.Г. Бабак, О.Ю. Шоева, А.В. Кильчевский, Е.К. Хлесткина

574 Влияние ограниченных интрогрессий от T*riticum timopheevii* Tausch. в геном мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на физиологические и биохимические признаки в условиях полива и засухи
Т.А. Пшеничникова, А.В. Пермяков, С.В. Осипова, М.Д. Пермякова, Е.Г. Рудиковская, В.В. Верхотуров

Популяционная генетика растений

581 Взаимосвязь аллозимного и фенотипического разнообразия популяций ели аянской (*Picea ajanensis*)
В.П. Ветрова, А.К. Экарт, А.Н. Кравченко, А.Я. Ларионова

Селекция растений

589 Селекция гибридных форм как стимул развития молекулярно-генетических исследований у ржи
Р. Шлегель

604 Подходы по улучшению качества зерна пшеницы: селекция на число падения
В.А. Крупнов, О.В. Крупнова

Селекция животных

613 Факторы изменчивости мотивированной страхом реакции удаления от человека у мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН
В.С. Ланкин, С.В. Никитин, О.В. Трапезов

624 Разнонаправленный половой диморфизм по живой массе у домашних свиней
С.В. Никитин, С.П. Князев, К.С. Шатохин, Г.М. Гончаренко, В.И. Ермолаев

Генетика человека и медицинская генетика

630 Полиморфизм гена *TRPM*8 в кыргызской популяции: возможная связь с высокогорной адаптацией
В.Н. Бабенко, Ж.Т. Исакова, Э.Т. Талайбекова, Д.А. Асамбаева, В.Ф. Кобзев, Т.А. Потапова, М.И. Воевода, А.А. Алдашев

638 Противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами рака мочевого пузыря
М.П. Смаль, А.И. Ролевич, Т.И. Набебина, С.А. Красный, Р.И. Гончарова

Content October 2015 • 19 • 5

Cytoplasmic heredity

511 Expression of the chloroplast genome: modern concepts and experimental approaches.
M.G. Siniauskaya, N.G. Danilenko, N.V. Lukhanina, A.M. Shymkevich, O.G. Davydenko

529 Identification of cytoplasm types in accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) with DNA markers
E.A. Domblides, A.S. Domblides, T.V. Zayachkovskaya, L.L. Bondareva

538 Effect of cytoplasmic male sterility type on chlorophyll content in leaves of grain sorghum hybrids
O.P. Kibalnik, L.A. Elkonin

Plant molecular genetics

545 Transgenic plants as a model for studying epigenetic regulation of gene expression
T.V. Marenkova, E.V. Deineko

552 Molecular-cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the tribe Triticeae species genetic material
O.A. Orlovskaya, I.N. Leonova, I.G. Adonina, E.A. Salina, L.V. Khotyleva, V.K. Shumny

Plant physiological and biochemical genetics

561 Molecular-genetic mechanisms underlying fruit and seed coloration in plants
V.F. Adzhieva, O.G.Babak, O.Y. Shoeva, A.V. Kilchevsky, E.K. Khlestkina

574 Effects of limited introgressions from *Triticum timopheevii* Tausch. into the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on physiological and biochemical traits under normal watering and drought
T.A. Pshenichnikova, A.V. Permyakov, S.V. Osipova, M.D. Permyakova, E.G. Rudikovskaya, V.V. Verchoturov

Plant population genetics

581 Relationships between the allozyme and phenotypic diversities of *Picea ajanensis* populations
V.P. Vetrova, A.K. Ekart, A.N. Kravchenko, A.Ya. Larionova

Plant breeding

589 Hybrid breeding boosted molecular genetics in rye
R. Schlegel

604 Approaches to improve wheat grain quality: breeding for falling number
V.A. Krupnov, O.V. Krupnova

Animal breeding

613 Factors contributing to the variation of the fearful withdrawal response to humans in minipigs bred at ICG SB RAS
V.S. Lankin, S.V. Nikitin, O.V. Trapezov

624 Multidirectional sexual dimorphism for the live weight in domestic pigs
S.V. Nikitin, S.P. Knyazev, K.S. Shatokhin, G.M. Goncharenko, V.I. Ermolayev

Human genetics and medical genetics

630 Polymorphism in the *TRPM8* gene in Kyrgyz population: putative association with highland adaptation
V.N. Babenko, J.T. Isakova, E.T. Talaibekova, D.A. Asambaeva, V.F. Kobzev, T.A. Potapova, M.I. Voevoda, A.A. Aldashev

638 The opposite association of *HRAS* and *KRAS* mutations with clinical variables of bladder cancer
M.P. Smal, A.I. Rolevich, T.I. Nabebina, S.A. Krasny, R.I. Goncharova

Уважаемые коллеги, дорогие читатели!

В этом выпуске представлены обзорные и экспериментальные статьи в области генетики человека, молекулярной, физиологической и биохимической генетики растений, селекции растений и животных. Отдельная рубрика посвящена нехромосомной наследственности.

Особое место среди публикаций выпуска занимает серия статей, подготовленных генетиками Беларуси. Их выход приурочен к пятидесятилетию Института генетики и цитологии Национальной академии наук Республики Беларусь.

Становление генетических исследований в Беларуси тесно связано с именем президента АН БССР академика А.Р. Жебрака – выдающегося генетика, специалиста в области отдаленной гибридизации пшениц и экспериментальной полиплоидии, смело выступавшего в защиту генетики. В 1955 году, еще в период гонений на генетику в СССР, блестящий ученый и организатор Николай Васильевич Турбин основал отдел генетики при Институте биологии АН БССР. В 1965 году отдел был преобразован в Институт генетики и цитологии. Со временем создания Института совпало и еще важное событие – в конце 1965 года было принято решение об организации Всесоюзного общества генетиков и селекционеров имени Н.И. Вавилова, а в 1972 году Н.В. Турбин занял пост президента ВОГиС после Б.Л. Астаурова.

Одним из первых подразделений Института стала лаборатория теоретической генетики, которую возглавлял академик АН БССР П.Ф. Рокицкий, внесший огромный вклад в развитие математической генетики и оставивший после себя богатую научную школу. Со дня основания в Институте под руководством академика НАН Беларуси Л.В. Хотылевой велись работы по гетерозису. Затем ею были инициированы исследования, связанные с созданием и использованием анеуплоидных форм пшеницы и новой зерновой культуры – тритикале. Под руководством академика НАН Беларуси Н.А. Картеля в Институте начаты исследования по молекулярной генетике и генетической инженерии растений, а по инициативе члена-корреспондента НАН Беларуси А.В. Кильчевского в Институте получили развитие работы в области биотехнологии и молекулярной селекции растений. Достижения сотрудников Института отмечены многочисленными советскими, национальными и международными премиями и наградами.

Желаем Институту генетики и цитологии НАН Беларуси новых выдающихся достижений, успехов и процветания!

Обращаем внимание наших читателей на несколько важных изменений в работе журнала. Начат прием статей через электронную редакцию: vavilov.elpub.ru/index.php/jour. Второе значимое событие – получение DOI (digital object identifier) через международное регистрационное агентство CrossRef. Теперь каждой статье журнала будет присвоен постоянный уникальный цифровой идентификатор DOI, который позволит однозначно определять местонахождение публикации в электронном пространстве и автора(ов) публикации. Наличие DOI облегчает процедуру цитирования, поиска и локализации научной публикации, что в итоге повышает вероятность цитирования работы в международных источниках.

Еще одно важное событие – появление нового цифрового издания «Письма в Вавиловский журнал» (www.bionet.nsc.ru/vogis/people/). С 2015 года Вавиловский журнал генетики и селекции публикует преимущественно результаты экспериментальных исследований и

обзорные статьи (www.bionet.nsc.ru/vogis/vestnik.php?f=rules&p=rules). Однако не иссякает интерес читателей и авторов к публикациям, освещающим важнейшие периоды в истории генетики, биографическим статьям о выдающихся генетиках и селекционерах. Актуальным остается подведение итогов значимых генетических конференций, которое ранее имело место на страницах журнала. В связи с этим было задумано новое электронное издание – «Письма в Вавиловский журнал», главными требованиями к которому стали: открытый доступ материалов, кратчайший срок с момента поступления статьи до ее опубликования, возможность представления богатого иллюстративного материала и качественный удобный для восприятия читателем дизайн.

Среди первых публикаций нового издания статья Э.И. Колчинского и С.Г. Инге-Вечтомова «Антилысенковец с довоенным стажем», посвященная столетию со дня рождения выдающегося историка генетики и библиографа Даниила Владимировича Лебедева (www.bionet.nsc.ru/vogis/download/anniversary/appx1.pdf), и статья «Парадоксы концептуальной истории генетики» М.Д. Голубовского (www.bionet.nsc.ru/vogis/download/history_of_Genetics/appx_1.pdf).

В новом издании также представлена статья О. Тарантиной «Н.В. Тимофеев-Ресовский и современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции», в которой рассказано о прошедшей в июне 2015 года в Санкт-Петербурге IV Международной конференции «Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции», приуроченной к 115-летию Н.В. Тимофеева-Ресовского, (www.bionet.nsc.ru/vogis/download/conference/appx_1.pdf), приведены иллюстрированные фотографиями интервью с участниками конференции.

В новом издании ведутся и страницы памяти о наших безвременно ушедших коллегах. В 2015 году не стало Дмитрия Геннадьевича Матишова, члена-корреспондента РАН, директора Института аридных зон ЮНЦ РАН (www.bionet.nsc.ru/vogis/download/memorial/matishov2.pdf). В 2014 году Дмитрий Геннадьевич вошел в состав Центрального Совета Вавиловского общества генетиков и селекционеров. В 2013 и 2014 годах им была проделана огромная работа по подготовке VI съезда ВОГиС, благодаря которой это крупнейшее научное мероприятие, состоявшееся в Ростове-на-Дону в июне 2014 года, прошло блестяще и вызвало самые теплые отзывы участников. Дмитрий Геннадьевич навсегда останется в нашей памяти как талантливый ученый и блестящий организатор, незаурядный, яркий человек.

Со всеми статьями нового издания можно ознакомиться на сайте www.bionet.nsc.ru/vogis/people/. Материалы для публикации принимаются в электронном виде. Просим присылать рукописи по электронной почте на адрес vavilov_journal@bionet.nsc.ru с пометкой в теме: «Письма в Вавиловский журнал».

Академик В.К. Шумный

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):511-528
DOI 10.18699/VJ15.068

Экспрессия хлоропластного генома: современные представления и экспериментальные пути изучения

М.Г. Синявская, Н.Г. Даниленко, Н.В. Луханина, А.М. Шимкевич, О.Г. Давыденко

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Уникальным свойством растений является наличие, кроме генома ядра, двух внеядерных геномов в хлоропластах и митохондриях. Геном хлоропластов относительно невелик – 100–120 генов, которые кодируют менее 5 % всех необходимых для функционирования пластид белков. Экспрессия генома пластид сохраняет черты прокариот: котранскрипцию генов в составе оперона, сходные с бактериями РНК-полимеразы и промоторы, присутствие 70S рибосом, однако появляются и новые свойства: транскрипция, не сопряженная с трансляцией, фагоподобные РНК-полимеразы, РНК эдитинг и сплайсинг транскриптов. Взаимодействие ядра (генома ядра) и цитоплазмы (генома пластид, митохондрий) в процессе развития растительного организма абсолютно необходимо для полноценного развития растения, адаптации (пластичности) к факторам окружающей среды. В обзоре обобщены современные представления об особенностях экспрессии генома пластид в клетке. Последовательно показано, что происходит при реализации генетической информации генома пластид в хлоропластах (транскрипции, эдитинге, сплайсинге, полиаденилировании, трансляции) и как отсутствие каких-либо компонентов отражается на функционировании растительной клетки и растения в целом. Описаны современные подходы к изучению пула транскриптов, выявлены критические точки ядерно-цитоплазматического взаимодействия при реализации функции хлоропластов в онтогенезе, воздействии факторов окружающей среды и др. Подробно представлена информация о важнейших факторах ядерно-цитоплазматического сигналинга у высших растений – сигма-факторах и PPR-белках, кодируемых ядром. Таким образом, показаны многоуровневость и целесообразность регуляции процессов экспрессии генома пластид в растительной клетке и взаимозависимость происходящих в разных компартментах клетки процессов. Составлена также сводка последних работ по изучению экспрессии генома пластид с помощью генетических чипов (микро- и макроэррей). Приведены результаты собственных исследований.

Ключевые слова: хлоропласт; пластиды; экспрессия; транскрипция; РНК-полимеразы; эдитинг; сплайсинг; трансляция; микроэррей; макроэррей.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Синявская М.Г., Даниленко Н.Г., Луханина Н.В., Шимкевич А.М., Давыденко О.Г. Экспрессия хлоропластного генома: современные представления и экспериментальные пути изучения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):511-528. DOI 10.18699/VJ15.068

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Siniauskaya M.G., Danilenko N.G., Lukhanina N.V., Shymkevich A.M., Davydenko O.G. Expression of the chloroplast genome: modern concepts and experimental approaches. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):511-528. DOI 10.18699/VJ15.068

Expression of the chloroplast genome: modern concepts and experimental approaches

M.G. Siniauskaya, N.G. Danilenko, N.V. Lukhanina, A.M. Shymkevich, O.G. Davydenko

Institute of Genetics and Cytology NASB, Minsk, Belarus

A unique feature of plants is the presence of two extranuclear genomes, chloroplasts and mitochondria. The chloroplast genome is relatively small, 100–120 genes, which encode less than 5 % of all proteins required for plastids to function. The cpDNA expression retains prokaryotic features, cotranscription in the operon, bacteria-like RNA polymerases and promoters, 70S ribosomes etc., also new characters appear such as uncoupling of transcription with translation, phage-type RNA polymerases, RNA editing, and splicing of primary transcripts. The interaction of the nucleus (nuclear genomes) and cytoplasm (plastid and mitochondrial genes) during plant development is necessary for proper development and adaptation to the environment. The aim of this review is to disclose the peculiarities of plastid genome expression. The way the genetic information in chloroplasts is used (transcription, editing, splicing, polyadenylation and translation) is consequently described. Furthermore, the importance of all expression machinery components in plant life is discussed. Modern approaches for RNA pool study are described and critical points of nuclear-cytoplasmic interaction in the functions of chloroplasts are revealed. The information about the most important factors of nuclear-cytoplasmic signaling in higher plants (sigma factors and PPR proteins encoded by the nucleus) are reviewed. Thus, the multilevelness and viability of plastid genome expression regulation in plant cells and interdependence of the processes in different compartments is proved. A summary of the latest studies of the expression of the plastid genome using genetic chips (microarrays, macroarrays) is provided. Original results are presented.

Key words: chloroplast; plastids; expression; transcription; RNA polymerases; editing; splicing; translation; microarray; macroarray.

УДК 575.13:577.21
Поступила в редакцию 14.07.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: cytoplasmic@mail.ru

Присутствие пластид в клетке – одно из уникальных свойств растений. Кроме выполнения функции фотосинтеза, пластиды участвуют в ряде других жизненно важных клеточных процессов: синтезе крахмала, жирных кислот, пигментов и аминокислот (Wicke et al., 2011). Геном хлоропластов растений представляет собой двухцепочечную ДНК, средний размер которой – 130–180 т. п. н., а копийность варьирует в пределах 8–1 000 копий на пластиду, до 50 пластид на клетку. У ячменя геном хлоропластов – 136 462 п. н., пшеницы – 134 545 п. н. В настоящее время в GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=2759&opt=plastid) имеется более 900 первичных нуклеотидных последовательностей пластомов эукариот, из них около 700 – для группы Viridiplantae, к которой относятся и высшие наземные растения. Большинство пластомов секвенировано после 2006 г., когда появились методы широкомасштабного секвенирования и стоимость анализа (сиквенса) значительно снизилась. Пластом фотосинтетических растений содержит от 70 (покрытосеменные) до 88 (мхи) генов, кодирующих белки, и 33 (большинство двудольных) – 34 (однодольные) – 35 (мхи) генов структурных РНК, в целом это 100–120 генов (Wakasugi et al., 1994; Ohyama, 1996; Bock, 2007). В табл. 1 на примере пшеницы (Ogihara et al., 2000) представлен типичный набор генов хлоропластной ДНК высших растений, число которых в различных таксонах высших растений примерно одинаково.

Предполагается, что для функционирования пластид высших растений требуется более 2100 белков (Leister, 2003), только менее 5 % кодируется их собственным геномом (Shiina et al., 2005). Биогенез и дифференциация пластид – результат координированной экспрессии ядерных и пластидных генов (Gray et al., 2003). Регуляция экспрессии генома пластид может осуществляться на уровне ДНК за счет изменения копийности пластома на органеллу, но в большей степени она модулируется за счет различных процессов, происходящих во время и после транскрипции, во время трансляции и посттрансляционно (Zhelyazkova, 2012).

Хлоропласты в клетке появились в результате эндосимбиоза примитивных эукариотических одноклеточных организмов с фотосинтезирующими прокариотами (Даниленко, Давыденко 2003), поэтому неудивительно, что экспрессия генома пластид сохраняет черты прокариот: организацию в оперон (котранскрипцию генов), сходные с бактериями РНК-полимеразы и промоторы, структуру мРНК, присутствие 70S рибосом и др. Но у них появляются и новые свойства: несопряженные транскрипция и трансляция, фагоподобные РНК-полимеразы, изменение первичных транскриптов в результате эдитинга и сплайсинга (Barkan, 2011; Cardi et al., 2012).

Транскрипция генома пластид – сложный процесс, важный для онтогенетической и адаптивной регуляции их работы. В транскрипционной регуляции пластид задействован ряд молекул: РНК-полимеразы, сигма-факторы, транскрипционные регуляторы, белки пластидного нуклеоида и различные сигнальные молекулы (Shiina et al., 2005). Транскрипция пластидного генома в значительной степени зависит от экспрессии генома ядра.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

хпДНК – хлоропластная ДНК
PEP – РНК-полимераза, кодируемая геномом хлоропластов
NEP – РНК-полимераза, кодируемая геномом ядра
ФС1 – фотосистема 1
ФС2 – фотосистема 2
dRNA-seq – дифференциальное РНК секвенирование
σ-фактор – сигма-фактор
SIG1–SIG6 – сигма-факторы арабидопсиса
срСК2 – хлоропластная казеин киназа 2
UTR (untranslated regions) – нетранслируемая область транскрипта
нкРНК – некодирующая РНК
PNPase (polynucleotide phosphorylase) – полинуклеотид фосфорилаза
RNase – рибонуклеаза
IR – инвертированный повтор
PPR-белки (pentatricopeptide repeat proteins) – белки с пентатрикопептидными повторами
MORF (multiple sites organellar RNA editing factors) – белок-фактор эдитинга, необходимый для редактирования многих сайтов
CRM белок (Chloroplast RNA splicing and ribosome maturation) – белок РНК сплайсинга хлоропластов и созревания рибосом
SD – последовательность Шайн – Дальгарно
qRT-PCR – ПЦР в режиме реального времени
RT-PCR – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции

Транскрипция генов пластид высших растений осуществляется двумя разными типами полимераз: кодируемой пластидами РНК-полимеразой бактериального типа (PEP) и кодируемой ядром фагоподобной РНК-полимеразой (NEP), которые распознают разные типы промоторов и отличаются транскрипционной активностью в разных типах пластид (Börner et al., 2015). Более 60 % пластидных генов считываются в виде мультицистронных (полицистронных), достаточно стабильных комплексов. У разных видов растений пластидные опероны консервативны (Kapoor, Sugira, 1998). Встречаются моно-, ди- и полицистронные комплексы.

Так, из 113 генов хлоропластного генома ячменя 86 входят в состав 20 оперонов (см. табл. 2), а 27 генов транскрибируются моноцистронно (Zhelyazkova et al., 2012).

Гены, кодирующие субъединицы одного комплекса или белки с общими функциями, в ряде случаев считываются в составе одного оперона, что определяет их скоординированную работу и стехиометрическую аккумуляцию. Такая организация способствует дифференциальной экспрессии генов транскрипционного/трансляционного аппарата относительно генов, кодирующих фотосинтетические белки (Baumgartner et al., 1993).

Таблица 1. Состав хлоропластного генома пшеницы (по: Ogihara et al., 2000; 2002)

Конечный продукт	Обозначение генов	Информация о кодируемом продукте
РНК	*23S rDNA, 16S rDNA, 5S rDNA, 4.5S rDNA*	Рибосомальные гены
	trn A, trnC, trnD, trnE, trnF, trnG, trnH, trnI, trnK, trnL, trnM (trnfM), trnN, trnP, trnQ, trnR, trnS, trnT, trV, trW, trnY	Гены тРНК (30 типов, соответствующих 20 аминокислотам)
Белки фотосинтетического аппарата	*PsaA, -B, -C, -I, -J*	Фотосистема 1
	PsbA, -B, -C, -D, -E, -F, -H, -I, -J,-K, -L,-M, -N, -T	Фотосистема 2
	PetA, -B, -D, -G	Цитохромы
	AtpA, -B, -E, -F, -H, -I	АТФ синтаза
	rbcL	Большая субъединица рибулозобифосфаткарбоксилазы
Рибосомальные белки	*rpl 2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36*	Большая субъединица рибосом
	rps 2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19	Малая субъединица рибосом
Белки транскрипционного/трансляционного аппаратов	*rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2*	Субъединицы РНК полимеразы
	infA	Трансляционный фактор
Прочие белки	*ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK*	Субъединицы НАДФ дегидрогеназы
	clpP	Протеиназа
	cemA	Белок мембраны хлоропластов
	matK	Матураза
	ycf3, ycf4, ycf5, ycf6, ycf9	Открытые рамки считывания, консервативные среди пластомов злаков

Большинство генов хлоропластной ДНК (хпДНК) могут транскрибироваться обоими типами полимераз, NEP и PEP, но с различных промоторов (Hajdukiewicz et al., 1997; Liere, Börner, 2007; Barkan, 2011). На табаке методом макроэррей показано, что в мутантном растении с дефектной полимеразой пластид (PEP) ядерная РНК-полимераза (NEP) транскрибирует весь пластидный геном, но по характерному, отличному от нормального, профилю. В этом же исследовании обнаружено не только количественное, но и качественное отличие транскриптов нормальных и PEP-дефектных растений (Legen et al., 2002). По-видимому, тип полимеразы, синтезирующей транскрипт, во многом определяет его дальнейшую судьбу: будет ли с него считываться нормальный белок? Наличие только одного какого-либо типа полимеразы, NEP или PEP, недостаточно для биогенеза фотосинтетически компетентных хлоропластов, так как некоторые гены хлоропластов нуждаются в транскрипции конкретной полимеразой для соответствующего уровня экспрессии, однако потеря активности PEP менее травматична для растения (Allison et al., 1996; Hess, Börner, 1999; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008).

NEP может быть представлена двумя типами РНК полимераз: RpoTp (функционирует в пластидах) и RpoTmp (у двудольных функционирует и в митохондриях, и в пластидах). Показана функциональная значимость RpoTp как на ранней, так и на поздней стадиях вегетативного развития растений (арабидопсис). RpoTmp особенно важна на ранней стадии (арабидопсис), на которой она выполняет специфическую функцию транскрипции rrn оперона (Courtois et al., 2007).

Современное развитие молекулярной биологии позволяет одновременно изучать особенности накопления транскриптов большого числа генов в различных объектах с помощью микроэррей (макроэррей). Имеется ряд исследований по геномике органелл, проводимых с помощью микроэррей (макроэррей) подходов, позволяющих глубже изучить особенности работы экспрессионного аппарата клетки растений.

Комплексное исследование транскриптома пластид томатов во время развития и созревания плодов при конверсии хлоропласт – хромопласт показало, что большинство пластидных генов ингибировано в большей степени в плодах, чем в листьях. Дифференциация хлоропласт – хромопласт (в плодах томатов) не вносит значительных изменений в уровень накопления пластидных транскриптов. Транскрипционное и трансляционное ингибирование (негативная регуляция) были более выражены для генов, имеющих отношение к фотосинтезу, по сравнению с генами, вовлеченными в экспрессию. *accD* – единственный пластидный ген (входит в цикл

Таблица 2. Возможные моно- и полицистронные транскрипционные комплексы (опероны) пластидных генов на примере ячменя (по: Zhelyazkova et al., 2012)

Транскрипционные комплексы	
Характеристика	Состав
Моноцистронные	*ndhF*, *psbA*, *psbM*, *rbcL*, *rpl23*, *rps16*, *psaI*, *psbN*, *petN*, *trnG-GGC*, *trnT-GGU*, *trnD-GUC*, *trnS-GGA*, *trnL-UAA*, *trnF-GAA*, *trnM-CAU*, *trnH-GUG*, *trnV-GAC*, *ccsA*, *trnN-GUU*, *trnL-CAA*, *trnP-UGG*, *trnW-CCA*, *trnC-GCA*, *trnS-UGA*, *trnS-GCU*, *trnQ-UGG*
Дицистронные и полицистронные	Состоит из генов с аналогичными или связанными функциями
	psbE-psbF–psbL-psbJ
	psbK-psbI-psbD–psbC-psbZ
	trnG-UCC-trnfM-CAU
	rpoB-rpoC1-rpoC2
	trnE-UUC-trnY-GUA
	Состоит из генов с гетерологичными функциями
	clpP-rps12 5′ -rpl20
	petL-petG-psaJ-rpl33-rps18
	psaA-psaB-rps14-trnfM-CAU-trnR-UCU
	psbB-psbT-psbH-petB–petD
	atpB-atpE-trnV-UAC–ndhC-ndhK-ndhJ
	rpl32-trnL-UAG
	trnT-UGU-rps4-ycf3
	ndhH-ndhA–ndhI- ndhG-ndhE-psaC-ndhD
	rps2-atpI-atpH-atpF-atpA
	ycf4-cemA–petA
	trnK-UUU-matK
	rps12 3′-rps7-ndhB
	trnI-CAU-rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3-rpl16-rpl14-rps8-infA-rpl36-rps11-rpoA
	rrn16-trnI-GAU-trnA-UGC-rrn23-rrn4.5-rrn5-trnR-ACG-rps15–ndhH

Подчеркнуты (например, *psbK*) гены, с которых может инициироваться транскрипция в составе оперона.

биосинтеза жирных кислот), который активно экспрессировался. По-видимому, именно для его работы в хромопластах поддерживалась экспрессионная активность (Kahlau, Bock, 2008).

При сравнении у картофеля уровня накопления транскриптов в клубнях и листьях получены аналогичные результаты: большинство генов ингибировалось в амилопластах клубней по сравнению с листьями. Для транскрибируемых в хлоропластах и амилопластах генов идентифицировались общие (идентичные) сайты инициации транскрипции, однако отмечено появление новых, уникальных для листьев или клубней. Также между двумя типами органелл наблюдались отличия в использовании промоторов. В целом ассоциация транскриптов с рибосомами в амилопластах была низкая, однако для транскрипта гена *accD* наблюдалась достаточно высокая ассоциация с рибосомами. Результаты двух вышеописанных исследований свидетельствуют о существовании общих регуляторных механизмов экспрессии органелл в амилопластах клубней и хромопластах плодов (Valkov et al., 2009).

Уровень транскриптов генов, кодирующих субъединицы фотосинтетических белков у растений *Nicotiana tabacum*, растущих на свету, был значительно выше, чем в темноте. Около 60 % зондов к фотосинтетически значимым генам показали по крайней мере двойное увеличение количества транскриптов в растущих на свету тканях (Nakamura et al., 2003 a).

При изучении уровня «steady-state» транскриптов у пшеницы показано, что на начальной стадии развития (замачивание/прорастание) уровень транскриптов генов фотосистемы 1 (ФС1) был значительно ниже, чем таковой фотосистемы 2 (ФС2) (Siniauskaya et al., 2008). Это вполне объясняется и биологически, так как ФС2 развивается и начинает функционировать раньше, чем ФС1 .

Сопоставление пластидного транскриптома листьев и женских цветков у огурца выявило значительное увеличение количества транскриптов 13 генов рибосомных белков и *rpoA*, *clpP*, *ycf1*, *ycf2*, *ycf15* в цветках при сильном репрессировании фотосинтетических генов. Наиболее яркий пример – значительно сниженные уровни транскриптов 8 генов *psb* (ФС2). У *ndhH*, единственного значимого для фотосинтеза гена, уровень экспрессии был повышен (Zmienko et al., 2011).

При изучении пула транскриптов в кончиках листа (апикальная часть) и у основания (базальная часть) у кукурузы показано, что РНК фотосинтетически важных генов занимают большую долю в кончике листа, тогда как в основании преобладают транскрипты генов энергетического обмена (Cahoon et al., 2008).

Дальнейший прогресс в изучении транскриптома высших растений (ячмень) достигнут благодаря исследованию Zhelyazkova с коллегами (2012). С использованием метода дифференциального РНК секвенирования (dRNA-seq) при сравнении двух кДНК библиотек, полученных из нормальных зеленых пластид ячменя и белых пластид мутанта ячменя *albostrians*, изучены первичные транскрипты пластид. В эксперимент специально была включена РНК пластома белых листьев (мутант ячменя albostrians), чтобы выявить разделение функций NEP и PEP в пластидах. Выяснилось, что только 11 генов пластид ячменя, *trnL-UAA*, *trnM-CAU*, *trnN-GUU*, *trnT*, *trnS-UGA*, *trnQ-UGG*, *psbE-F-L-J*, *petN,* транскрибируются исключительно PEP. Показано, что PEP является доминирующей полимеразой пластид зрелых листьев ячменя и 88 % TSS (сайтов начала транскрипции) зеленых листьев ячменя приходятся на PEP. Результаты dRNA-seq показали, что в хпДНК намного больше промоторов, чем генов, поэтому наличие промоторов к обеим полимеразам является характерной чертой генов пластид. Возможно, это имеет адаптивную функцию. Таким образом, в растительных пластидах множественные промоторы запускают транс-

крипцию индивидуальных генов и оперонов, в результате генерируются различные транскрипты одного и того же гена, что востребовано функционально, позволяя растениям максимально быстро адаптироваться к меняющимся внешним и внутренним условиям. Более того, идентификация множества сайтов инициации транскрипции в составе (внутри) оперонов (см. табл. 2) свидетельствует о потенциальной возможности транскрипционного разъединения генов в полицистронном генном кластере (Zhelyazkova et al., 2012). Это путь образования менее сложных транскриптов и увеличения количества индивидуальных мРНК, транскрибируемых с одного и того же оперона, который ведет к дифференциальной экспрессии генов внутри одного оперона.

Интенсивность транскрипции индивидуальных генов в составе одного оперона очень консервативна, хотя различные участки одного и того же оперона могут транскрибироваться неравномерно (Алейникова и др., 2011). Как было показано на ячмене, гены оперонов *rrn16*, *rps2*, *psaA* и *atpB,* в состав которых входят функционально несвязанные белки или РНК, транскрибируются неравномерно (Алейникова, 2012). Оперон *atpB-atpE-trnV-ndhC-ndhK-ndhJ* характеризовался значительно большей интенсивностью транскрипции генов *atpB* и *trnV* в сравнении с другими генами (не менее чем в 3 раза). В опероне *psaA* первые два гена транскрибировались равномерно, а ген *rps14*, относящийся функционально к другой группе, транскрибировался значительно более интенсивно. Данными исследованиями подтверждена дифференциальная регуляция транскрипции индивидуальных генов в составе оперонов (Алейникова, 2012).

Инициация транскрипции – один из важнейших этапов в экспрессии генома во многих организмах. Ранее считалось, что транскрипция не играет значимую роль в регуляции экспрессии генов пластид, а более важными являются посттранскрипционные процессы. Эти представления были пересмотрены после открытия и изучения σ-факторов (сигма-факторов). σ-факторы – белки ядерного кодирования, придающие промоторную специфичность PEP комплексу. В ферментативном комплексе PEP (прокариотического типа) σ-фактор функционирует как субъединица, распознающая промоторную область генов (Toyoshima et al., 2005). С РНК-полимеразой σ-факторы взаимодействуют в двух процессах, которые определяют успех и эффективность транскрипции – в распознавании промотора и плавлении ДНК (Lerbs-Mache, 2011).

Разные σ-факторы имеют конкретные функции в регуляции экспрессии генома пластид и отвечают за транскрипцию определенного набора генов (Yagi, Shiina, 2014). Разнообразие σ-факторов и использование их растениями в зависимости от сигналов окружающей среды, стадий развития организма, типа пластид обеспечивает соответствующую регуляцию транскрипции (Allison, 2000; Toyoshima et al., 2005; Liere, Börner, 2007; Lerbs-Mache, 2011).

Существуют предположения о том, что наличие множества промоторов и σ-факторов в хлоропластах необходимо для поддержания функционального состояния генетической системы хлоропластов при возникающих мутациях (Maier et al., 2008) или, что более вероятно, для обеспечения согласованной работы всего транскрипционного аппарата в различных условиях (Lerbs-Mache, 2011). Возможно, оба предположения о функциональном значении множественности промоторов и σ-факторов в хлоропластах отражают разные стороны процесса транскрипции, особенности которого еще далеко не изучены.

Все известные σ-факторы растений относятся к группе σ70 (primary sigma factors). Большинство геномов высших растений кодируют шесть σ-факторов (Lyska et al., 2013). У *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) из шести σ-факторов SIG1–SIG6 два (SIG2 и SIG6) жизненно необходимы для полноценного функционирования пластид (фотоавтотрофного роста). Предполагаемая роль SIG1 – быстрая адаптация активности ФС1 к ежедневным изменениям в интенсивности освещения, возможна также его роль во взаимодействии хозяин – патоген (Lerbs-Mache, 2011). SIG2 участвует в распознавании промоторов и специфической транскрипции некоторых генов *mPHK* и *psaJ*, *psbD*, *psbA*, *rbcL* (кДНК микрочипирование арабидопсиса). SIG3 осуществляет специфическую инициацию транскрипции в промоторе гена *psbN* и может также влиять на экспрессию оперона *psbB* через транскрипт *psbT* («антисмысловой», образующийся с другой цепи ДНК в другом направлении) (Zghidi et al., 2007). SIG4 особенно значим для транскрипции гена *ndhF*. SIG5 необходим для распознавания светозависимого промотора (от голубого света) гена *psbD*, а также в циркадной регуляции транскрипции отдельных генов хлоропластов (Noordally et al., 2013). SIG6 играет «глобальную» роль во время ранней дифференциации пластид и развития растения (Lerbs-Mache, 2011). Информация о σ-факторах и их роли в растении представлена в табл. 3.

Модификация σ-факторов через фосфорилирование влияет на экспрессию генома пластид. Важнейшим регулятором активности σ-факторов и, следовательно, транскрипции является кодируемая ядром хлоропластная казеин киназа 2 (cpCK2) (Schweer et al., 2010).

Недавно было детально изучено взаимодействие генов комплекса АТФ-синтазы (важнейшего для фотосинтетических процессов и дыхания) и σ-факторов (Ghulam et al., 2012). У высших растений гены АТФ-синтазного комплекса разобщены и организованы в два оперона, большой (*atpI/H/A*) и малый (*atpB/E*). На арабидопсисе продемонстрировано, как в хлоропластах преодолевается физическая разобщенность кластера генов АТФ-синтазного комплекса (atp) и координируется его транскрипция. Оба промотора atp оперонов PEP-зависимые и требуют σ-факторы для специфического распознавания. Транскрипция этих оперонов инициируется одним общим σ-фактором, SIG2, который определяет синтез базисного уровня мРНК генов *atp*, кодирующих различные субъединицы АТФ-синтазы. Далее в транскрипционной инициации большого и малого оперонов *atp* участвуют σ-факторы SIG3 и SIG6 соответственно, которые модулируют экспрессию генов *atp* в зависимости от физиологических и природных условий. Сочетание регуляции транскрипции *atpH* мРНК SIG3 фактором и специфическая стабилизация этих транскриптов через взаимодействие с белком PPR10, возможно, является для хлоропластов механизмом контроля экспрессии гена *atpH*, кодирующего субъединицы C и размер C кольца у АТФ-синтазы.

Таблица 3. Сигма-факторы растений и их функциональная роль в пластидах (на примере арабидопсиса) (по: Lerbs-Mache, 2011 с дополнениями)

Ген арабидопсиса, кодирующий σ-фактор	σ-фактор	Биохимический процесс	Биологическая функция в пластидах
At1g64860	SIG1	Фосфорилирование Взаимодействие с SIB1*	Быстрая адаптация активности ФС1 к изменениям в интенсивности освещения. Транскрипция *psaA*, *psbB*, *psbE* (Tozawa et al., 2007)
At1g08540	SIG2		Регуляция трансляции и биосинтеза хлорофилла через транскрипцию тРНК. Стабилизация ФС1 через транскрипцию *psaJ* . Преодоление физической разобщенности *atp* кластера в хпДНК и координация его транскрипции (Ghulam et al., 2012). Переключение РНК-полимераз с NEP на PEP через взаимодействие с RPOTp
At3g53920	SIG3	Протеолитическое расщепление?	Специфическая транскрипция *psbN* – регуляция экспрессии *psbT* через продуцирование антисенс РНК. Участие в транскрипционной инициации большого *atp* кластера, *atpI/H/F/A* (Ghulam et al., 2012)
At5g13730	SIG4		Специфическая транскрипция *ndhF*
At5g24120	SIG5		Специфическая транскрипция гена *psbD* с чувствительного к синему свету промотора. Циркадная регуляция транскрипции отдельных генов хлоропластов
At2g36990	SIG6	Фосфорилирование, взаимодействие с DG1**	Важнейший σ-фактор на ранней стадии развития. Участие в транскрипционной инициации малого *atp* кластера, *atpB/atpE*, на поздних стадиях развития растения (Ghulam et al., 2012)

* SIB1 – белок, взаимодействующий с SIG1, играет роль в защитной реакции растений; ** DG1 – PPR-белок, взаимодействующий с SIG6, выполняет регуляторную функцию.

Известно, что в зависимости от вида количество С субъединиц в кольце АТФ-синтазы может варьировать от 10 до 15 (Stock et al., 1999; Pogoryelov et al., 2005, 2007). Количество С субъединиц – крайне важный параметр для АТФ-синтазного комплекса, так как он определяет количество H+ (протонов), которые транслоцируются через мембрану для синтеза АТФ. Очень интересная гипотеза – увеличение размера С кольца, возможно, является той ценой, которую растению приходится платить за синтез АТФ в неблагоприятных условиях. Вероятно, в хлоропластах существует регуляторный механизм для увеличения эффективности работы АТФ-синтазы за счет изменения количества субъединиц в С кольце в результате воздействия различных стрессовых факторов (Ghulam et al., 2012).

Экспрессия генома пластид в онтогенезе

Изначально была предложена так называемая «каскадная модель активации плазмона через NEP» (Liere, Maliga, 2001). Как полагали, активность NEP необходима для инициирования PEP на ранних стадиях развития хлоропластов путем транскрипции оперона, содержащего гены *rpoA* и *rpoB* субъединиц PEP. Затем NEP в большей мере замещается на PEP, и последняя селективно транскрибирует гены фотосинтетических комплексов. По мере того как появляются фотосинтетически зрелые хлоропласты, активность PEP снижается до уровня «steady-state». Эта гипотеза достаточно хорошо объясняла регуляцию генов пластид в онтогенезе, однако результаты многих последующих исследований по транскрипции свидетельствовали об ином.

В работе Cahoon с коллегами (2004) на кукурузе показано, что по мере развития хлоропластов активность обоих типов полимераз увеличивается, но наблюдается разница в стабильности их транскриптов. Количество фермента NEP уменьшается по мере взросления растений, и наблюдается повышенная дестабилизация ее транскриптов, однако за счет повышения активности данной полимеразы в зрелых хлоропластах уровень мРНК, продуцируемых NEP, остается в клетке примерно тем же (Cahoon et al., 2004). Транскрипционная активность PEP растет по мере развития хлоропластов при неизменном или даже увеличивающемся уровне стабильности ее транскриптов. Поэтому Cahoon с коллегами (2004) отметили характерную черту экспрессии генома пластид в онтогенезе – различие в накоплении транскриптов генов, продуцируемых двумя полимеразами, NEP и PEP. В процессе развития пластид количество транскриптов NEP практически не менялось, а количество транскриптов PEP увеличивалось.

Далее на арабидопсисе и шпинате было показано, что NEP и PEP уже изначально представлены в семенах, а применение Tagetina (специфического ингибитора активности PEP) подтвердило, что PEP необходима для эффективного прорастания семян, так как обеспечивает транскрипцию рибосомальных РНК (Demarsy et al., 2006). Этими же исследователями обнаружено, что при прорастании семян арабидопсиса все три полимеразы NEP (RpoTp, RpoTmp и PEP) активно синтезируют новые пластидные мРНК уже

на этапе замачивания/стратификации семян (стадия 0+). RpoTp транскрибирует гены рибосомных белков и PEP субъединиц, а RpoTmp и PEP – оперон *rRNA*. Перенос на свет (стадия прорастания после 0+) запускает транскрипцию посредством PEP фотосинтетически значимых генов (*rbcL* транскрибируется первым). По мере дальнейшего развития проростков (стадия 1–2) PEP продолжает активную транскрипцию генов ФС1, ФС2 и электрон-транспортной цепи (Demarsy et al., 2012).

Число синтезированных NEP транскриптов генов субъединиц PEP и белков рибосом со стадии 0+ резко перестает расти и идет на спад, а на стадии 1 (появление корешков) поддерживается на определенном стабильном уровне либо уменьшается. Фаза высокой активности NEP – самые ранние этапы прорастания семени арабидопсиса – характеризуется высоким уровнем транскрипции всего пластидного генома, приводя к продукции (считыванию) антисмысловых РНК с генов, локализованных на противоположной цепи ДНК. Отметим, что количественное соотношение смысловых и антисмысловых РНК для преобладающего большинства пластидных мРНК изменялось в зависимости от стадии развития растения и дифференциации пластид. Стадии стратификации и появления корня (0–1) характеризовались высоким уровнем антисмысловых РНК при малом значении отношения количества смысловых РНК к антисмысловым (смысловые/антисмысловые). В зеленых тканях (стадии 2–4 – рост корня, зеленение проростков, раскрытие семядолей) для большинства пластидных мРНК смысловых транскриптов значительно больше, чем антисмысловых, поэтому отношение смысловые/антисмысловые РНК увеличивается (Demarsy et al., 2012). Неясно функциональное значение образования антисмысловых РНК, имеет ли оно регуляторную функцию переключения полимераз с NEP на PEP, или это сопутствующее данному процессу явление.

Характерной чертой экспрессии генов в хлоропластах наземных растений является сложность популяции (пула) молекул РНК, возникающих при транскрипции большинства генов (Barkan, 2011). Пул пластидных РНК содержит первичные и процессированные («зрелые») транскрипты. Разнообразие транскриптов в хлоропластах образуется при инициации транскрипции не с одного промотора, а с разных (для одних и тех же генов), далее – с последующим процессингом РНК по множеству различных возможных сайтов. Пример, показывающий возможность накопления различных транскриптов для генного кластера, – *psbB* оперон (Barkan, 1988; Westhoff, Hermann, 1988). Одна проба к данному кодирующему району позволяет идентифицировать 15 и более типов транскриптов (Stern et al., 2010).

Происходящие после транскрипции РНК-процессинг и стабилизация – деградация транскриптов более значимы в регуляции экспрессии генома пластид (работе пластид), чем сама транскрипция (Del Campo, 2009).

Процессинг РНК

Первичные транскрипты хлоропластных генов считываются в виде полицистронных молекул, которые разрезаются на отдельные фрагменты, а затем их 5′-, 3′-концы подвергаются модификациям (созреванию). 5′-UTR (5′ untranslated regions) и 3′-UTR области транскриптов предотвращают быструю деградацию первичных транскриптов, обеспечивая их стабильность (Del Campo, 2009). Они необходимы для посттрансляционной регуляции экспрессии (Stern et al., 2010; Zhelyzkova et al., 2012).

Непроцессированные (первичные) 5′-концы хлоропластных транскриптов несут 5′-ди- или трифосфаты, процессированные хлоропластные транскрипты имеют монофосфорилированные 5′-концы (Zhelyzkova et al., 2012). У «зрелых» мРНК они формируются двумя возможными механизмами: 5′–3′ экзонуклеолитический путь и сайт-специфическое расщепление эндорибонуклеазами (Stern et al., 2010).

Считается, что основным механизмом «созревания» 5′-концов является эндонуклеолитический путь, однако появились факты и в пользу другого предположения. В этих процессах участвует RNase J, с меньшей вероятностью – RNase E. RNase J является основной рибонуклеазой, ответственной за «созревание» 5′-концевых участков хлоропластных транскриптов, на которых РНК-связывающиеся белки (кодируемые в ядре PPR-белки (pentatricopeptide repeat proteins)) функционируют как барьеры для ее активности (Luro et al., 2013). Таким образом, степень 5′-процессинга транскрипта определяется PPR-белками, а также вторичной структурой самой молекулы РНК (Stern et al., 2010).

Транскрипционная терминация в хлоропластах неэффективна, поэтому большинство 3′-концов «зрелых» пластидных мРНК образуется в результате процессинга первичного транскрипта. При формировании 3′-концевых районов участвуют экзо-, эндонуклеазы и РНК-связывающиеся белки. В хлоропластах растений достаточно хорошо изучены две экзорибонуклеазы – PNPase и RNR1 (RNase R). 3′-концы формируются главным образом благодаря 3′–5′ экзорибонуклеазной активности полинуклеотид фосфорилазы (polynucleotide phosphorylase – PNPase). Данный фермент чувствителен к наличию вторичных структур РНК и терминальных IR (инвертированных повторов), поэтому ингибируется на 3′«stem-loop» структурах (Yehudai-Resheff et al., 2001). О значимости данного фермента говорит тот факт, что у растений с отсутствием PNPase формирование 3′-концов *rbcL* и *psbA* мРНК не завершено (Walter et al., 2002).

Не у всех хлоропластных мРНК может образовываться 3′«stem-loop» структура, и именно такие мРНК – кандидаты для стабилизации с помощью малых некодирующих РНК (нкРНК). Они обнаружены в большом количестве в хлоропластах различных растений (Hotto et al., 2011; Zhelyzkova et al., 2012). нкРНК пластид синтезируются как с межгенных районов, так и в виде антисмысловых транскриптов (для примерно 35 % всех генов зеленых пластид). По данным Hotto с коллегами (2011), у арабидопсиса обнаружено не менее 39 хлоропластных нкРНК, комплементарных 3′-концам смысловых хлоропластных мРНК. Для бактерий известно, что нкРНК, связывясь с 3′-концами мРНК, стабилизируют данные мРНК, блокируя работу 3′–5′-экзорибонуклеазы (Opdyke et al., 2004). Возможно, аналогичное происходит и в хлоропластах. Самый простой пример стабилизации РНК с помощью нкРНК – антисмысловая РНК гена *psbT*, которая, об-

разуясь, стабилизирует комплементарную смысловую *psbT* мРНК через формирование двунитевых РНК/РНК гибридов, приводя к трансляционной инактивации *psb*T мРНК и защите ее от нуклеолитической деградации в условиях окислительного стресса (Zghidi-Abouzid et al., 2011).

Предполагается, что каждая малая РНК соответствует месту связи с PPR- белком (является как бы «отпечатком» PPR-белка), а одной из хорошо документированных функций этих белков является защита прилежащей РНК от деградации экзонуклеазами (Loiselay et al., 2008; Zhelyazkova et al., 2012). Таким образом, стабилизация транскрипта происходит через связывание с PPR белками. Это описано для PPR10, CRP1, HCF152 белков (Barkan et al., 1994; Meierhoff et al., 2003; Nakamura et al., 2003b; Pfalz et al., 2009), подобные функции предполагаются и для других PPR и TPR-подобных белков, специфичных для различного набора транскриптов (Barkan, 2011; Lyska et al., 2013). В качестве примера можно привести PPR10 белок, который связывается с 5′- и 3′-районами хлоропластных транскриптов *psaJ-rpl33* или *atpI-atpH*, защищая их от экзонуклеаз в обоих 5′- и 3′-направлениях. При связывании с 5′-концом *atpH* PPR10 активизирует трансляцию, высвобождая связывающийся с рибосомой район из РНК дуплекса (Prikryl et al., 2011). Потеря PPR-белка ведет к потере соответствующей мРНК (Schmitz-Linneweber et al., 2005). Этот механизм защиты мРНК (и, по-видимому, контроля их уровня) является уникальным для органелл растений, и пока не ясно, встречается ли аналогичный в ядре.

Эдитинг – важнейший этап в посттранскрипционном контроле экспрессии генов органелл. Был открыт в митохондриях в 1989 г. (Covello, Gray, 1989; Gualberto et al., 1989; Hiesel et al., 1989), затем в пластидах в 1991 г. (Hoch et al., 1991) как процесс модификации последовательности транскрипта в результате конверсии C нуклеотида в U, приводящий к возникновению последовательности, отличной от кодируемой ДНК. Эдитинг наблюдается у всех наземных растений, за исключением печеночных мхов (Rüdinger et al., 2008). В пластидах высших растений обнаружен в основном C-U эдитинг (Takeneka et al., 2013).

Одно из предположений: эдитинг возник изначально для коррекции мутаций генома, которые появлялись в ходе заселения Земли растениями. Результатом такой «правки» было обеспечение синтеза нормального белка. Действительно, эдитинг часто изменяет (восстанавливает) ту аминокислоту, которая важна для функции протеина (Sugita et al., 2006). В результате эдитинга также может возникать новый инициирующий трансляцию кодон или, наоборот, стоп-кодон. Однако эдитинг происходит и в тех точках генома, где это непосредственно не отражается на функции кодируемого белка (Okuda et al., 2010) – в нетранслируемых районах РНК (5′, 3′ UTR), интронах. Частота эдитинга в некодирующих районах очень низка по сравнению с кодирующими. Существует предположение о необходимости эдитинга для эффективного последующего сплайсинга (Takenaka et al., 2013).

Обычно в различных мРНК пластид семенных растений имеется около 30–40 специфических сайтов эдитинга. У арабидопсиса их 43 в 18 генах, из них 36 – в кодирующих областях (Ruwe et al., 2013). Однодольные и двудольные растения отличаются друг от друга по более чем половине сайтов эдитинга (Barkan, 2011).

В геноме митохондрий сайтов эдитинга значительно больше. Так, у арабидопсиса и риса найден 441 (Giege, Brennicke, 1999) и 491 (Notsu et al., 2002) сайт эдитинга соответственно.

Разные исследователи неоднократно пытались выявить характерные черты последовательности РНК в области сайта эдитинга (*cis*-элементы) (Bock, Koop, 1997; Miyamoto et al., 2004). Отмечено, что последовательность РНК в 20–25 нуклеотидов, расположенная выше (5′) сайта эдитинга, содержит в себе специфические элементы, необходимые для его распознавания (Bock et al., 1996; Chateigner-Boutin et al., 2003; Verbitskiy et al., 2008). Далее при детальном исследовании *in vitro* и *in organello* показано, что «критические нуклеотиды» для эдитинга расположены с 5-го по 15-й нуклеотид выше редактируемого C (Takenaka et al., 2013).

Трансфакторами эдитинга растений, распознающими последовательность РНК, являются PPR-белки PLS группы.

PPR-белки делятся на две большие группы белков, P и PLS белки (Shikanai, Fujii, 2013). «P» группа PPR-белков необходима на различных этапах созревания РНК транскрипта, и такие белки состоят из канонического 35-аминокислотного повтора (PPR мотива), повторяющегося тандемно до 30 раз (P-область). Однако в эдитинге участвует другая группа PPR-белков – «PLS» белки, которые характеризуются наличием трех типов повторов: канонического (P), чуть более длинного (L) (примерно из 36 аминокислот) и короткого (S) (из 31–34 аминокислот) (Small, Peeters, 2000; Lurin et al, 2004; Schmitz-Linneweber, Small, 2008). На C конце этих белков расположен E (extended domain) домен, который, как предполагают, непосредственно взаимодействует с ферментом эдитинга. У примерно половины PLS белков за E доменом располагается DYW домен, названный так за наличие высококонсервативного трипептида аспартат-тирозин-триптофана (DYW) (см. рис. 1). Возможно, при эдитинге он обладает каталитической активностью (Manna, 2015).

Каждый такой белок может участвовать в эдитинге от 1 до 10 сайтов. Возможно даже перекрывание «специфичности» PPR-белков, при котором в одном и том же сайте эдитинга функционируют несколько PPR-белков. PPR-белки, участвующие в эдитинге, связываются с РНК обратимо, так как зрелые мРНК должны быть доступны для синтеза белка в рибосомах. Связывание РНК с PPR-белками документировано пока только для нескольких участвующих в эдитинге РНК PPR-белков, однако более интенсивно изучено и подтверждено для PPR-белков процессинга РНК (Okuda et al., 2006; Williams-Carrier et al., 2008).

Не так давно был найден новый класс белков, функционирующих в растительной «эдитосоме» и необходимых для эдитинга в органеллах, это MORF (multiple sites organellar RNA editing factors) белки. Каждый такой белок задействован в редактировании не одного, а многих сайтов эдитинга. Так, у арабидопсиса в ядре кодируются 10 членов этого семейства: два из них работают только

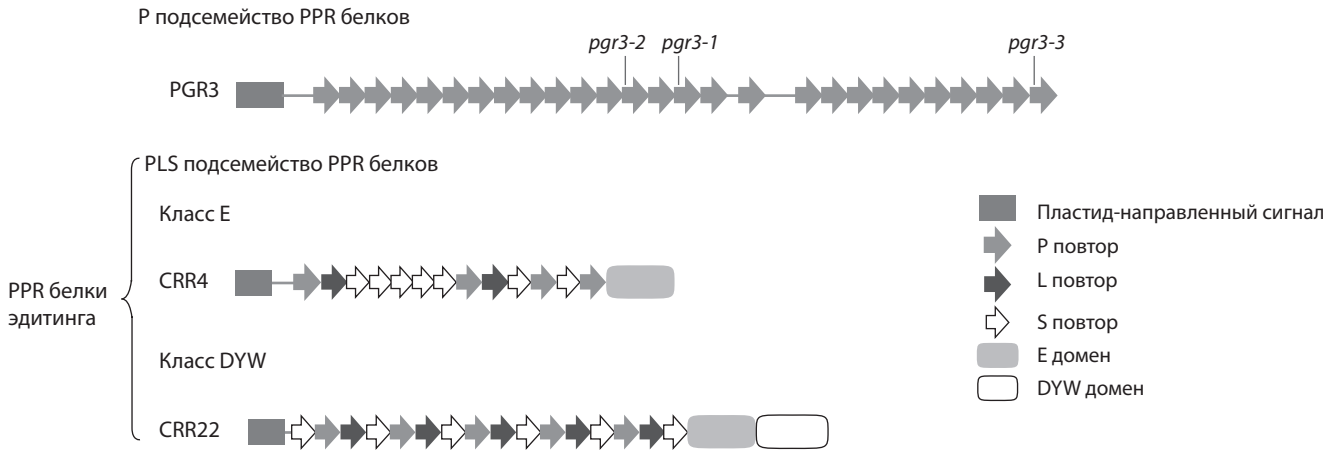


Рис. 1. Схема организации PPR белков (по: Shikanai, 2015).

в пластидах, пять – только в митохондриях и два – как в хлоропластах, так и в митохондриях. Обнаружено, что для большинства точек эдитинга хлоропластных транскриптов требуется одновременное функционирование обоих MORF белков хлоропластов (ориентированных для работы исключительно в данной органелле), так как дефекты в любом из них влияют на успешность прохождения данного процесса (Takenaka et al.,2012; Bentolila et al., 2013). Два MORF белка формируют функциональный гетеродимер, который только в некоторых случаях может замещаться гомодимером. Кроме того, около 20 % эдитинга в пластидах контролируется работой MORF белка, функционирующего как в хлоропластах, так и в митохондриях (Bentolila et al., 2013). Предполагаемая функция MORF белков в гипотетической «эдитосоме» пока еще не определена. Возможно, они являются связующим звеном между PPR-белками и ферментом эдитинга (Takenaka et al., 2013).

В основе процесса эдитинга в хлоропластах лежит дезаминирование цитидина. Реакция, происходящая с C основанием, аналогична конверсии единичного нуклеотида (single nucleotid conversion) в пути биосинтеза уридина, осуществляемого цитидин дезаминазой, при котором сахаро-фосфатный «скелет» РНК в точке эдитинга остается интактным, а C нуклеотид модифицируется. Фермент, катализирующий реакцию РНК эдитинга в хлоропластах, до сих пор экспериментально не выявлен, однако предполагают, что это может быть: 1) классическая цитидин дезаминаза; 2) PPR-белок с DYW доменом (содержит аминокислотный мотив классической цитидин дезаминазы), обеспечивающий цитидин дезаминазную активность; 3) фермент с модифицированной трансаминазной активностью (Salone et al., 2007; Takenaka et al., 2013).

Эдитинг РНК необходим для функционирования растительных органелл (пластид) и выживания растений. Является ли эдитинг регуляторным процессом для адаптации растений к меняющимся условиям окружающей среды, все еще предстоит выяснить (Takenaka et al., 2013).

Считается, что эдитинг – самый ранний процесс модификации мРНК, предшествующий сплайсингу и рестрикции полицистронных транскриптов (Freyer et al. 1993; Schmitz-Linneweber, Regel, 2002; Del Campo, 2009). Однако сплайсинг интронов, формирование «зрелых» концов мРНК, эдитинг могут происходить в разной очередности, некоторые сайты на границе экзонов редактируются только после сплайсинга прилежащих интронов (Li-Pook-Than, Bonen, 2006).

Сплайсинг – необходимый процесс в созревании РНК в органеллах, в результате которого удаляются интроны, прерывающие рамку считывания генов, ответственных за фотосинтез и экспрессию пластома. Растительные органеллы содержат два основных типа интронов: интроны групп I и II, которые различаются по структуре и механизмам сплайсинга. Двадцать из двадцати одного пластидного интрона наземных растений принадлежат к группе II, а один в *trnL–UAA* гене – к группе I (Cardi et al., 2012). В сплайсинге каждого интрона участвует множество ядерно кодируемых белков (de Longevialle et al., 2010). Значительный прогресс достигнут в идентификации этих белков, и обнаружено 16 ядерных генов, продукты которых требуются для сплайсинга одного или нескольких хлоропластных интронов группы II (Germain et al., 2013, см. рис. 2).

Белки, участвующие в сплайсинге в хлоропластах, не родственны белкам сплайсинга транскриптов ядра. У большинства хлоропластных сплайсинг-факторов имеются связывающиеся с РНК домены типа CRM, PORR, APO, PPR, OPR, характерные для белков, функционирующих в органеллах. Наиболее широко представлены два семейства белков: CRM белки (Chloroplast RNA splicing and ribosome maturation), функционирующие в нескольких разных сайтах сплайсинга, и PPR белки, специфичные только для одного транскрипта (Schmitz-Linneweber, Small, 2008; Stern et al., 2010). Кроме того, в сплайсинге ряда интронов группы II участвует хлоропластно кодируемая матураза (ген *matK* расположен в интроне гена *trnK*), жизненно необходимая для нормального развития растений (Rogalski et al., 2006; Legen et al., 2007).

В хлоропластах нет «сплайсеосом», аналогичных ядерным. Сплайсинг интронов – сложный процесс, во-

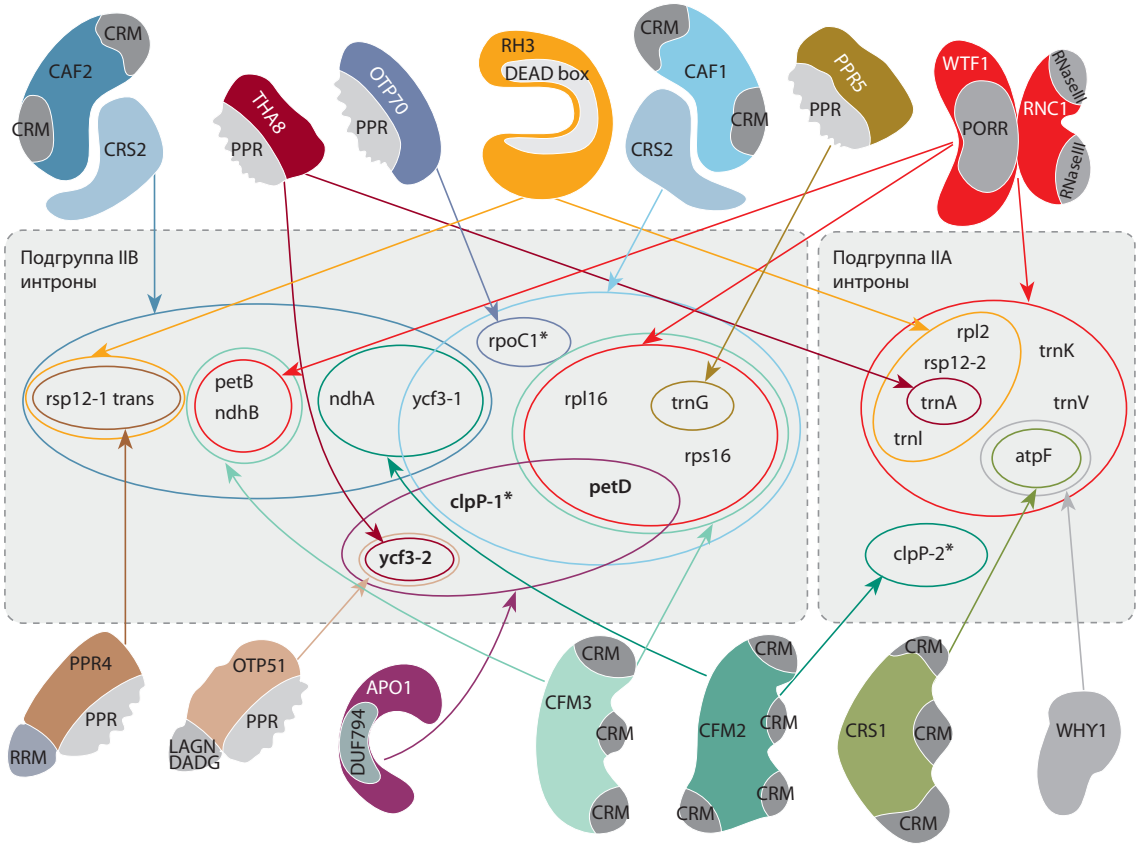


Рис. 2. Ядерно-кодируемые белки сплайсинга интронов II группы в хлоропластах покрытосеменных (по: Germain et al., 2013).

влекающий в себя огромное количество факторов (белков). Хлоропластные факторы сплайсинга взаимодействуют в различных комбинациях, образуя комплексы с интронными РНК, каждый для обеспечения сплайсинга набора определенных интронов (Germain et al., 2013). Сплайсинг катализируется самой РНК, и сплайсинг-факторы играют «добавочную» роль. Эти факторы, связываясь с РНК, способствуют ее соответствующей укладке для формирования каталитически компетентной структуры.

Несомненно, сплайсинг играет регуляторную роль в онтогенезе растения. Он также может приводить к изменению относительных количеств зрелых мРНК в пуле РНК в зависимости от условий окружающей среды, выполняя адаптивную функцию (Stern et al., 2010).

Уровень транскриптов генов хлоропластов также зависит от скорости их деградации. В деградацию РНК в пластидах вовлечено полиаденилирование, которое в ядре обеспечивает стабилизацию мРНК, но у прокариот (и в пластидах) является сигналом нестабильности (разрушения) (Cardi et al., 2012).

На основании исследований *in vitro* и *in vivo* ясно показано, что полиаденилирование может способствовать деградации РНК в хлоропластах, так как сродство полинуклеотид фосфорилазы к полиаденилированным РНК повышается. Данный фермент является основным в «глобальном» процессе деградации РНК в клетке. Однако пока до конца не выяснено, насколько полиаденилирование важно для метаболизма РНК в пластидах (RNA turnover) (Germain et al., 2013).

В хлоропластах в промежуточном продукте деградации 3′-концов найдены полиА-последовательности (poly(A) tails), которые состоят не только из аденозина, но и из небольшого количества других остатков, в основном из гуанозина. Показано, что полиаденилированные транскрипты деградируют быстрее, чем неаденилированные. Молекулярные механизмы деградации РНК в хлоропластах напоминают таковые у бактерий – после эндонуклеолитического расщепления РНК происходит полиаденилирование. Полиаденилированный продукт расщепления затем подвергается быстрой экзонуклеолитической деградации полинуклеотид фосфорилазами и, возможно, другими экзонуклеазами (Del Campo, 2009). Не ясно, является ли полинуклеотид фосфорилаза единственным ферментом полиаденилирования в хлоропластах, но это пока единственный фермент, функция которого в полиаденилировании подтверждена (Stern et al., 2010).

Детектируемое количество полиаденилированных транскриптов пластид крайне мало, для обнаружения их требуется около 50 циклов ПЦР (Kudla et al., 1996). В EST базах полиаденилированных РНК они встречаются только эпизодически. Вероятно, их низкая встречаемость отражает их быструю деградацию, однако это может быть и следствием незначительной роли полиаденилирования в метаболизме хлоропластной РНК, что предстоит выяснить в будущем (Germain et al., 2013).

Процессы транскрипции и трансляции в хлоропластах

не сопряжены жестко, поэтому существует дополнительный уровень регуляции для предотвращения инициации конститутивной трансляции мРНК через взаимодействия последовательности Шайн – Дальгарно (SD) и 16S рибосомальной РНК (SD–16S взаимодействия).

Трансляция пластидных транскриптов происходит на 70S рибосомах бактериального типа. Хлоропластные гомологи бактериальных факторов инициации и элонгации идентифицированы, и некоторые из них охарактеризованы (Lin et al., 1996; Albrecht et al., 2006; Shen et al., 2013). Существует определенная степень сходства между факторами трансляции и рибосомальными белками пластид и бактерий, однако наблюдаются и значительные отличия (Beligni et al., 2004). Обе (большая и малая) субъединицы рибосом наряду с белками, аналогичными бактериальным, включают в свой состав ядерно кодируемые пластид-специфические белки (PSRP) (Yamaguchi et al., 2002, 2003; Tiller et al., 2012).

Хлоропластная рибосома состоит из двух субъединиц, 50S и 30S. Обе субъединицы представляют собой комплексы, состоящие из одной или более специфических рибосомных РНК и множества белков. 30S субъединица несет 16S рРНК, а 50S субъединица – 23S, 5S, 4.5S (последней субъединицы нет у бактерий, но, вероятно, она образовалась из 23S рРНК фрагментацией (Tiller, Bock, 2014). 30S субъединица хлоропластных рибосом состоит из 24 белков, из которых 3 специфичны для хлоропластов (PSRP), а 21 белок – ортологи *E. coli* 30S рибосомных белков. В 50S субъединице содержатся 33 белка: 31 ортолог бактериальным белкам и 2 белка, специфичных для хлоропластов (PSRP) (Tiller, Bock, 2014). Специфические для пластид рибосомные белки (PSRP), вероятно, играют структурную роль в пластидной рибосоме (Sharma et al., 2007).

Инициация трансляции – важнейший этап в пластидной трансляции. Критическая ступень в инициации трансляции – выбор корректного старт-кодона из нескольких возможных. Инициирующий кодон у цветковых растений – AUG, реже – GUG (Sugiura et al., 2014). Цис-элементы в 5’UTR являются важнейшими детерминантами для корректной инициации и регуляции трансляции (Staub, Maliga, 1993; Sugiura et al., 2014).

Организация цис-элементов. Особенностью трансляции в хлоропластах является изобилие цис-элементов (элементов последовательности РНК) в 5′UTR хлоропластных мРНК. В 5′-районах UTR пластидных транскриптов найдены SD (Shine-Dalgarno)-подобные последовательности (Sugiura et al., 1998), функция которых состоит в инициации трансляции через обозначение корректной позиции для ассоциации транскриптов с рибосомами. SD элементы в консенсусной позиции имеются, примерно, у 1/3 хлоропластных генов наземных растений, и для некоторых из них действительно подтверждено, что они инициируют трансляцию. Однако у большинства хлоропластных генов отсутствует характерно расположенная SD последовательность, и связыванию и/или расположению инициирующего трансляцию комплекса вдоль мРНК способствуют альтернативные цис-элементы и транс-действующие факторы (Sugiura et al., 1998; Barkan, 2011; Sugiura, 2014). Так, у табака трансляция транскриптов *rbcL*, *atpE*, *rps14* зависима, *rps12*, *petB* – частично зависима, а *psbA*, *atpB* – независима от SD последовательностей (Lyska et al., 2013).

Показано, что области инициации трансляции без SD районов менее структурированы, чем имеющие SD последовательности, отсюда предположено, что доступность старт-кодона особенно критична при отсутствии SD взаимодействий (Tiller, Bock, 2014). Отсутствие формирования вторичной структуры вокруг старт-кодона, по-видимому, способствует распознаванию точки начала трансляции и связыванию 30S субъединицы рибосом. После того как выбран старт-кодон, в процесс вовлекается 50S субъединица, что способствует превращению преинициирующего комплекса в активный инициирующий, который далее переходит на стадию элонгации.

Механизмы регуляции (настройки) трансляции с помощью цис-элементов в значительной степени варьируют. Так, ряд альтернативных цис-элементов в 5′UTR пластидных транскриптах участвует в инициации трансляции для мРНК, которые не используют SD последовательности. Но существует другой вариант, при котором они дополняют SD последовательности или обеспечивают специфическую регуляцию трансляции в ответ на сигналы этапов развития организма или окружающей среды (Peled-Zehavi, Danon, 2007). SD последовательность гена *rps2* функционирует как негативный регулятор трансляции, с которым также взаимодействуют транс-действующие факторы (Plader, Sugiura, 2003).

Регуляторные цис-элементы были обнаружены в 5′UTR генов *psbC*, *petD* и *rps7 Chlamydomonas* (Zerges et al., 1997, 2003; Fargo et al., 1999) и гена *atpB* мРНК табака (Hirose, Suigura, 2004) в составе мишеней для транс-действующих факторов.

Транс-факторы трансляции кодируются в ядре и в основном специфичны для индивидуальных транскриптов. Они участвуют в инициации трансляции через связывание с их 5′UTR, высвобождая сайты связывания с рибосомами (Barkan, 2011; Prikryl et al., 2011). Эти функции выполняют PPR-белки, такие как PPR10, HCF152, CRP1, PPR38 (*atpI-atpH*, *psbH-petB*, *petB-petD* и *clpP-rps12* транскриптов соответственно), которые ранее были идентифицированы у арабидопсиса, кукурузы, мха *Physcomitrella patens* (Meierhof et al., 2003; Schmitz-Linneweber et al., 2005; Hattori, Sugita, 2009; Pfalz et al., 2009; Barkan, 2011; Prikryl et al., 2011). Еще один PPR-белок, HCF107, найденный у арабидопсиса и кукурузы, регулирует стабильность и трансляцию *psbH* транскрипта (Stoppel, Meurer, 2013). Описывается большое количество новых транс-факторов, но как они взаимодействуют с цис-элементами – пока не ясно.

В хлоропластах по сравнению с прокариотами преобладает позитивная регуляция трансляции, в то время как у прокариот вторичная структура цис-элементов или белка, связывающегося с мРНК, выступает в качестве ингибирующего трансляцию фактора, блокируя доступ к сайту инициации (Gold, 1988; Kozak, 2005).

Скорость трансляции индивидуальных мРНК регулируется несколькими предполагаемыми механизмами: 1) изменением окислительно-восстановительного потенциала (redox regulation), через которое сопрягаются трансляция

Таблица 4. Сводка опубликованных статей по экспрессии геномов органелл у растений с помощью микроэррей (макроэррей) за период 2002–2014 гг.

Организм	Тип набора генов	Эксперимент	Литературный источник
Табак	Макроэррей на мембране – ПЦР продукт к 118 генам и 11 orf хлоропластов	Транспластомный табак с отсутствием PEP, сравнение экспрессии с диким типом растений	Legen et al., 2002
	кДНК микроэррей из 220 ПЦР зондов (71–2 373 п. н.), соответствующих отдельным генам, межгенным участкам	Проростки, выращенные на свету/темноте, RIP-chip анализ MatK-связывающихся РНК	Nakamura et al., 2003a; Zoschke et al., 2010
Physcomitrella patens	кДНК микроэррей, 108 фрагментов ДНК для детекции всех генов пластид	Изучение трансформантов без гена тРНК аргинина	Nakamura et al., 2005
Арабидопсис	кДНК микроэррей, 79 ПЦР зондов (88–1 646 п. н.), соответствующих протеин-кодирующим генам	Изучен эффект потери гена *Sig2* на «глобальную» экспрессию генов пластид	Nagashima et al., 2004
Кукуруза (ячмень как пример кросс-видовой гибридизации)	кДНК микроэррей, 248 перекрывающихся ПЦР продуктов (73–1 653 п. н.), составляющих весь геном пластид	Идентификация РНК, ассоциированных с PPR белками у кукурузы (CRP1, PPR4, PPR5) или whirly у ячменя (RIP-chip)	Schmitz-Linneweber et al., 2005; Melonek et al., 2010
Chamydomonas reinhardtii	кДНК микроэррей, ПЦР продукты (150–1 500 п. н.) для 47 генов пластид, 9 митохондриальных и 15 ядерных генов	Изучение нефотосинтетических мутантов, несущих мутации в ядерном гене *Mcd1*	Erikson et al., 2005
Cyanidioschyzon merolae	кДНК микроэррей, 193 ПЦР зондов для протеин-кодирующих проб и orf	Роль кодируемых ядром сигма-факторов в изменении транскриптома пластид при сдвиге темнота – свет	Minoda et al., 2005
	Олигонуклеотидный микроэррей из зондов к генам митохондрий, ядра и хлоропластов	Координация экспрессии генов пластиды – митохондрии динамично модулируется светом и клеточным циклом у *C. merolae*	Kanesaki et al., 2012
Пшеница	Макроэррей, 67 ПЦР зондов (200–1 259 п. н.) к 60 генам пластид (без тРНК), 7 ядерным генам, необходимым для работы пластид	Прорастающие семена и проростки на трех разных стадиях развития	Siniauskaya et al., 2008
	Макроэррей пшеницы – ПЦР продукт 28 генов митохондрий и 5 генов ядра, функционально важных для работы митохондрий, нанесен на мембрану	Исследован «steady-state» уровень митохондриальных и некоторых ядерных транскриптов на ранних стадиях развития проростков пшеницы в нормальных и стрессовых условиях	Khanam et al., 2007
Кукуруза	кДНК микроэррей, ПЦР зонды к 887 ядерным, 62 хлоропластным и 27 митохондриальным генам и orf	Сравнение экспрессии генов хлоро- и этиопластов у проростков кукурузы на стадии второго листа	Cahoon et al., 2008
Табак, картофель, томаты	Олигонуклеотидный микроэррей, 128 зондов (68–71 нуклеотид), гены хлоропластов табака, ycf и orf	Созревание плодов томатов, конверсия хлоропласт – хромопласт	Kahlau et al., 2008; Valkov et al., 2009;
Euglena gracilis	Макроэррей, 96 ПЦР зондов (75–400 п. н.) ко всем генам, псевдогенам и orf эвглены	12 различных стадий развития и воздействие стресса	Geimer et al., 2009
Арабидопсис	Макроэррей, 94 ПЦР проб к генам пластидных протеинов, тРНК и рРНК	Ядерные мутанты арабидопсиса с нарушениями функционирования хлоропластов в различных условиях произрастания и под воздействием различных стрессовых факторов, данные сопоставлены с опубликованными результатами экспериментов с Affymetrix 22K ATH1 чипом ячменя	Cho et al., 2009

Окончание таблицы 4

Организм	Тип набора генов	Эксперимент	Литературный источник
Огурец (кросс-видовая гибридизация на 9 видах из самых различных таксонов)	Олигонуклеотидный микроэррей, 1 629 олигонуклеотидных зондов, как обычных, так и «тиллинг» зондов, равномерно распределенных между кодирующими и некодирующими участками	Приводится дизайн микроэррей, детальный протокол мечения РНК и последующей гибридизации. Проведен пробный эксперимент на РНК огурца и РНК др. таксонов: арабидопсиса, табака, томата, шпината, салата, люцерны, лотоса, тополя, ячменя. Этот микроэррей – отличное многостороннее приспособление для глобальных функциональных исследований геномов пластид	Zmienko et al., 2011
Арабидопсис	Олигонуклеотидный микроэррей (60 п. н. зонды), сенс-, антисенс зонды, весь пластидный транскриптом	Исследование изменений в пластидном транскриптоме и в работе транскрипционного аппарата у растений на уровне мРНК и белка во время трех стадий формирования семян. Результаты свидетельствуют о том, как быстро может происходить восстановление работы транскрипционного аппарата пластид при замачивании (прорастании семян).	Allorent et al., 2013

и фотосинтетический перенос электронов; 2) механизмом авторегуляции, соединяющим трансляцию и сборку белковых комплексов хлоропластов (CES – **c**ontrol by **e**pistasy of **s**ynthesis). CES механизм подобен негативной регуляции у прокариот (Kozak, 2005). Компоненты мембраны, не вошедшие в комплексы (т. е. если компоненты мембраны присутствуют в избытке), подавляют инициацию своей собственной трансляции через 5′UTR. Такая авторегуляция – основная черта пластид у хламидомонад, подобный тип регуляции уже описан для гена *rbcL* табака (Wostrikoff, Stern, 2007).

Трансляция хлоропластных транскриптов происходит по типу транскрипт-специфической регуляции (т. е. более специализирована) по сравнению с прокариотами.

Установлено, что трансляционный аппарат пластид тонко реагирует на абиотический стресс, особенно температурный (Xu et al., 2013). Уровень большинства пластидных мРНК остается относительно неизменным в условиях свет – темнота, но скорость трансляции резко возрастает при изменении освещения, стадии развития или при влиянии иных факторов, например созревании. Это обеспечивается через существование и функционирование множества транс-факторов трансляции, которые участвуют в адаптивном видоизменении процесса, а именно в пластичности трансляционной системы хлоропластов в ответ на различные воздействия (Sugiura, 2014).

По всей видимости, трансляционная активность пластид генерирует ретроградный сигнал, влияющий на специфические аспекты растительной анатомии и морфологии, но как этот сигнал включается (где он входит) в крайне сложный пейзаж взаимоотношений пластиды – ядро – необходимо еще установить (Tiller, Bock, 2014).

Последние десятилетия знаменательны для развития высокоразрешающих методов в биологии. Эти методы позволили исследователям сфокусироваться на изучении целостных систем (геномов, транскриптомов или протеомов) вместо исследования индивидуальных генов или путей. Примерно за десятилетие использование ДНК микроэррей (microarray) стало лидирующей методологией для изучения общей (глобальной) экспрессии генов в растениях и животных. ДНК микроэррей – мультиплексная технология, используемая в молекулярной биологии и медицине (Schena et al., 1995; Kehoe et al., 1999; Stoughton, 2005).

Применение генетических чипов (микроэррей) для изучения экспрессии геномов клеточных органелл и взаимодействия их с ядром – закономерная ступень в развитии исследований в данной области. В настоящее время имеется достаточно большое количество работ по исследованию экспрессии генома органелл, краткая сводка по этому вопросу приведена ниже. Как видно из табл. 4, это макро- и микроэррей эксперименты с самыми различными задачами, решая которые исследователи пытаются выйти на конкретные гены с оценкой их функции в системе взаимодействия ядро–цитоплазма и влияния этих взаимодействий на различных этапах реализации генетической информации хлоропластов и митохондрий, от транскрипции до трансляции.

Ранее в лаборатории нехромосомной наследственности ИГиЦ НАНБ была создана модельная коллекция аллоплазматических линий ячменя (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum*) с маркированными геномами хлоропластов и митохондрий. На основании изучения данной коллекции показано, что замещение ядра на различных цитоплазматических фонах приводит к изменению ряда характеристик фотосинтетического аппарата: содержания хлорофиллов и каротиноидов, количества $Q_в$-невосстанавливающих центров ФС2, нефотохимического тушения хлорофиллов и др. (Шимкевич и др., 2006). Для исследования последствий замещения на молекулярно-генетическом уровне (уровне пула транскриптов) был разработан набор ДНК зондов к геномам хлоропластов и митохондрий, который сначала нанесли на мембрану, получив макроэррей (Siniauskaya et

al., 2008; Синявская и др., 2012), на стекло – микроэррей (66 зондов к генам органелл, а также ядерным генам, ориентированным функционально в хлоропласты). Проведен эксперимент по микроэррей гибридизации данных проб с флюоресцентно меченой кДНК ячменя. Таким образом, начато изучение профилей экспрессии генов митохондрий и хлоропластов у линий аллоплазматического ячменя и их эуплазматических аналогов в нормальных условиях и при периодическом температурном стрессе. Обнаружено, что уровень транскриптов одного и того же гена может значительно изменяться в зависимости от конкретной ядерно-цитоплазматической комбинации как в норме, так и при стрессе. Температурный стресс в общем влияет негативно на пул транскриптов, уменьшая их количество.

Выявлены неоднозначные различия в уровне транскриптов отдельных генов ФС2 (хлоропласты) и комплекса I,V (митохондрий) между аллоплазматическими линиями и сортом ячменя-донора ядра. Для одних генов наибольший уровень транскрипта был у исходного сорта, а по другим генам – у аллоплазматических линий. По-видимому, это проявление того, что ядерно-цитоплазматические отношения видоизменяют возможный ответ растения на стресс (температуру), т. е. определяют адаптивность. В настоящее время полученные результаты верифицируются методами qRT-PCR, RT-PCR и, конечно, нуждаются в дальнейшей проверке.

Таким образом, в данном обзоре предпринята попытка собрать и проанализировать информацию об этапах экспрессии генома пластид, показать многоуровневость и целесообразность регуляции и взаимозависимость происходящих в разных компартментах клетки процессов.

Благодарности

Исследование проведено при финансовой поддержке ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» 2011–2015 гг. «Геномика» 2.35.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алейникова А.Ю. Неравномерность транскрипции генов в составе хлоропластных оперонов ячменя: Автореф. дис. … канд. биол. наук. М., 2012.

Алейникова А.Ю., Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Интенсивность транскрипции генов *atpB* оперона хлоропластов листьев ячменя в зависимости от действия разных факторов. Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2011;3(15):139-142.

Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогия, 2003.

Синявская М.Г., Сивицкая Л.Н., Давыденко О.Г. Создание макроэррей для изучения экспрессии геномов органелл у злаков. Генетика и биотехнология XXI в.: проблемы, достижения, перспективы (к 100-летию со дня рождения акад. Н.В. Турбина). Матер. междунар. науч. конф. Минск, 8–11 октября 2012 г. Минск, Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2012.

Шимкевич А.М., Макаров В.Н., Голоенко И.М., Давыденко О.Г. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата у аллоплазматических линий ячменя. Экол. генетика. 2006;4(3): 37-42.

Albrecht V., Ingenfeld A., Apel K. Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. Plant Mol. Biol. 2006;60(4):507-518. DOI: 10.1007/s11103-005-4921-0

Allison L. The role of sigma factors in chloroplast transcription. Biochimie. 2000;82(6-7):537-548. DOI: 10.1016/S0300-9084(00)00611-8

Allison L., Simon L., Maliga P. Deletion of *rpoBm* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. EMBO J. 1996;15(11):2802-2809.

Allorent G., Courtois F., Chevalier F., Lerbs-Mache S. Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation. Plant Mol. Biol. 2013;82(1):59-70. DOI: 10.1007/s11103-013-0037-0

Barkan A. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. EMBO J. 1988;7(9):2637-2644.

Barkan A., Walker M., Nolasco M., Johnson D. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. EMBO J. 1994;13(13):3170-3181.

Barkan A. Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. Plant Physiol. 2011;155(4):1520-1532. DOI: 10.1104/pp.110.171231

Baumgartner B.J., Rapp J.C., Mullet J.E. Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development evidence for selective stabilization of psbA mRNA. Plant Physiol. 1993; 101(3):781-791.

Beligni M.V., Yamaguchi K., Mayfield S.P. The translational apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Photosynth. Res. 2004;82(3):315-325.

Bentolila S., Oh J., Hanson M.R., Bukowski R. Comprehensive high-resolution analysis of the role of an Arabidopsis gene family in RNA editing. PLoS Genet. 2013;9(6):e1003584. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003584

Bock R. Structure, function, and inheritance of plastid genomes. Topics in Current Genetics. V. 19. Cell and Molecular Biology of Plastids. Ed. R. Bock. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag, 2007:29-63. DOI: 10.1007/978-3-540-75376-6

Bock R., Hermann M., Kössel H. *In vivo* dissection of cis-acting determinants for plastid RNA editing. EMBO J. 1996;15(18):5052-5059.

Bock R., Koop H.U. Extraplastidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. EMBO J. 1997;16(11):3282-3288.

Börner T., Aleynikova A.Y., Zubo Y.O., Kusnetsov V.V. Chloroplast RNA polymerases: role in chloroplast biogenesis. Biochim. Biophys. Acta. 2015;1847(9):761-769. DOI: 10.1016/j.bbabio.2015.02.004

Cahoon A.B., Harris F.M., Stern D.B. Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. EMBO Rep. 2004;5(8):801-806. DOI: 10.1038/sj.embor.7400202

Cahoon B., Takacs E., Sharpe R., Stern D. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial transcript abundance along a maize leaf developmental gradient. Plant Mol. Biol. 2008;66(1-2):33-46. DOI: 10.1007/s11103-007-9250-z

Cardi T., Giegé P., Kahlau S., Scotti N. Expression profiling of organellar genes. Advances in Photosynthesis and respiration. Genomics of Chloroplasts and Mitochondria. Ed. R. Bock, V. Knoop. Springer, 2012,35:323-355. DOI: 10.1007/978-94-007-2920-9

Chateigner-Boutin A., Hanson L, Maureen R. Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar cis-elements. Nucl. Acids Res. 2003;31(10):2586-2594. DOI: 10.1093/nar/gkg354

Cho W.K., Geimer S., Meurer J. Cluster analysis and comparison of various chloroplast transcriptomes and genes in *Arabidopsis thaliana.* DNA Res. 2009;16(1):31-44. DOI: 10.1093/dnares/dsn031

Courtois F., Merendino L., Demarsy E., Mache R., Lerbs-Mache S. Phage-type RNA polymerase *RPOTmp* transcribes the rrn operon from the PC promoter at early developmental stages in Arabidopsis.

Plant Physiol. 2007;145(3):712-721. DOI: 10.1104/pp.107.103846
Covello P.S., Gray M.W. RNA editing in plant mitochondria. Nature. 1989;341(6243):662-666. DOI: 10.1038/341662a0
de Longevialle A.F., Small I.D., Lurin C. Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles. Mol. Plant. 2010;3(4):691-705. DOI: 10.1093/mp/ssq025
Del Campo E.M. Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. Gene Regul. Syst. Biol. 2009;3:31-47.
Demarsy E., Courtois F., Azevedo J., Buhot L., Lerbs-Mache S. Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. Plant Physiol. 2006;142(3): 993-1003. DOI: 10. 1104/pp. 106. 085043
Demarsy E., Buhr F., Lambert E., Lerbs-Mache S. Characterization of the plastid-specific germination and seedling establishment transcriptional programme. J. Exp. Bot. 2012;63(2):925-939. DOI: 10.1093/jxb/err322
Erikson B., Stern D., Higgs D. Microarray analysis confirms the specificity of a *Chlamydomonas reinhadtrii* chloroplast RNA stability mutant. Plant Physiol. 2005;137(2):534-544. DOI: 10.1104/pp.104.053256
Fargo D.C., Boynton J.E., Gillham N.W. Mutations altering the predicted secondary structure of a chloroplast 5' untranslated region affect its physical and biochemical properties as well as its ability to promote translation of reporter mRNAs both in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast and in *Escherichia coli*. Mol. Cell Biol. 1999;19(10):6980-6990.
Freyer R., Hoch B., Neckermann K., Maier R.M., Kössel H. RNA editing in maize chloroplasts is a processing step independent of splicing and cleavage to monocistronic mRNAs. Plant J. 1993;4(4):621-629. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1993.04040621
Geimer S., Belicová A., Legen J. Transcriptome analysis of the *Euglena gracilis* plastid chromosome. Curr. Genet. 2009;55(4):425-438. DOI: 10.1007/s00294-009-0256-8
Germain A., Hotto A.M., Barkan A., Stern D.B. RNA processing and decay in plastids. RNA (WIREs RNA). 2013;4(3):295-316. DOI: 10.1002/wrna.1161
Ghulam M.M., Zghidi-Abouzid O., Lambert E., Lerbs-Mache S., Merendino L. Transcriptional organization of the large and the small ATP synthase operons, *atpI/H/F/A* and *atpB/E*, in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. Plant Mol. Biol. 2012;79(3):259-272. DOI: 10.1007/s11103-012-9910-5
Giege P., Brennicke A. RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999; 96(26):15324-15329. DOI: 10.1073/pnas.96.26.15324
Gold L. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Biochem. 1988;57:199-233.
Gray J.C., Sullivan J.A., Wang J.H., Jerome C.A., MacLean D. Coordination of plastid and nuclear gene expression. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 2003;358(1429):135-145. DOI: 10.1098/rstb.2002.1180
Gualberto J.M., Lamattina L., Bonnard G., Weil J.H., Grienenberger J.M. RNA editing in wheat mitochondria results in conservation of protein sequences. Nature. 1989;341(6243):660-662. DOI: 10.1038/341660a0
Hajdukiewicz P.T., Allison L.A., Maliga P. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. EMBO J. 1997;16(13):4041-4048.
Hattori M., Sugita M. A moss pentatricopeptide repeat protein binds to the 3'end of plastid clpP pre-mRNA and assists with mRNA maturation. FEBS J. 2009;276(20):5860-5869. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07267.x
Hess W.R., Börner T. Organellar RNA polymerases of higher plants. Int. Rev. Cytol. 1999;190:1-59.
Hiesel R., Wissinger B., Schuster W., Brennicke A. RNA editing in plant mitochondria. Science. 1989;246(4937):1632-1634. DOI: 10.1126/science.2480644
Hirose T., Sugiura M. Multiple elements required for translation of plastid atpB mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence. Nucl. Acids Res. 2004;32(11):3503-3510. DOI: 10.1093/nar/gkh682
Hoch B., Maier R.M., Appel K., Igloi G.L., Kössel H. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. Nature. 1991;353(6340):178-180. DOI: 10.1038/353178a0
Hotto A.M., Schmitz R.J., Fei Z., Ecker J.R., Stern D.B. Unexpected diversity of chloroplast noncoding RNAs as revealed by deep sequencing of the Arabidopsis transcriptome. G3 (Bethesda). 2011;1(7):559-570. DOI: 10.1534/g3.111.000752
Kahlau S., Bock R. Plastid transcriptomics and translatomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. Plant Cell. 2008;20(4):856-874. DOI: 10.1105/tpc.107.055202
Kanesaki Y., Imamura S., Minoda A., Tanaka K. External light conditions and internal cell cycle phases coordinate accumulation of chloroplast and mitochondrial transcripts in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. DNA Res. 2012;19(3):289-303. DOI: 10.1093/dnares/dss013
Kapoor S., Sugira M. Expression and regulation of plastid genes. Photosynthesis: A Comprehensive Treatise. Camridge, UK: Cambr. Univ. Press, 1998.
Kehoe D., Villand P., Somerville S. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. Trends Plant Sci. 1999;4(1):38-41. DOI: 10.1016/S1360-1385(98)01354-5
Khanam S.M., Naydenov N.G., Kadowaki K., Nakamura C. Mitochondrial biogenesis as revealed by mitochondrial transcript profiles during germination and early seedling growth in wheat. Genes Genet. Syst. 2007;82(5):409-420. DOI: 10.1266/ggs.82.409
Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. Gene. 2005;361:13-37. DOI: 10.1016/j.gene.2005.06.037
Kudla J., Hayes R., Gruissem W. Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. EMBO J. 1996;15(24):7137-7146.
Legen J., Kemp S., Krause K., Profanter B., Herrmann R.G., Maier R. M. Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. Plant J. 2002;31(2):171-188. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01349.x
Legen J., Wanner G., Herrmann R.G., Small I., Schmitz-Linneweber C. Plastid tRNA genes *trnC-GCA* and *trnN-GUU* are essential for plant cell development. Plant J. 2007;51(5):751-762. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03177.x
Leister D. Chloroplast research in the genomic age. Trends Genet. 2003;19(1):47-56. DOI: 10.1016/S0168-9525(02)00003-3
Lerbs-Mache S. Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? Plant Mol. Biol. 2011;76(3–5):235-249. DOI: 10.1007/s11103-010-9714-4
Liere K., Börner T. Transcription and transcriptional regulation in plastids. Topics in Current Genetics. Cell and Molecular Biology of Plastids. Ed. R. Bock. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 2007;19: 121-174. DOI: 10.1007/978-3-540-75376-6
Liere K., Maliga P. Plastid RNA polymerases in higher plants. Regulation of photosynthesis. Eds B. Andersson, E.-M. Aro. Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2001.
Lin Q., Yu N.-J., Spremulli L.L. Expression and functional analysis of *Euglena gracilis* chloroplast initiation factor 3. Plant Mol. Biol. 1996;32(5):937-945.
Li-Pook-Than, J., Bonen L. Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. Nucl. Acids Res. 2006;34(9): 2782-2790. DOI: 10.1093/nar/gkl328
Loiselay C., Gumpel N.J., Girard-Bascou J., Watson A.T., Purton S., Wollman F.-A., Choquet Y. Molecular identification and function of *cis*- and *trans*-acting determinants for *petA* transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. Mol. Cell Biol. 2008; 28(17):5529-5542. DOI: 10.1128/MCB.02056-07

Lurin C., Andres C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. Plant Cell. 2004;16(8):2089-2103. DOI: 10.1105/tpc.104.022236

Luro S., Germain A., Sharwood R., Stern D.B. RNase J participates in a pentatricopeptide repeat protein-mediated 5' end maturation of chloroplast mRNAs. Nucl. Acids Res. 2013;41(19):9141-9151. DOI: 10.1093/nar/gkt640

Lyska D., Meierhoff K., Westhoff P. How to build functional thylakoid membranes: from plastid transcription to protein complex assembly? Planta. 2013;237(2):413-428. DOI: 10.1007/s00425-012-1752-5

Maier U.G., Bozarth A., Funk H.T., Zauner S., Rensing S.A., Schmitz-Linneweber C., Börner T., Tillich M. Complex chloroplast RNA metabolism: just debugging the genetic programme? BMC Biology. 2008;6(36):1-9. DOI: 10.1186/1741-7007-6-36

Manna S. An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. Biochimie. 2015;113:93-99. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.04.004

Meierhoff K., Felder S., Nakamura T., Bechtold N., Schuster G. HCF152 an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. Plant Cell. 2003;15(6):1480-1495. DOI: 10.1105/tpc.010397

Melonek J., Mulisch M., Schmitz-Linneweber C., Grabowski E., Hensel G., Krupinska K. Whirly1 in chloroplasts associates with intron containing RNAs and rarely co-localizes with nucleoids. Planta. 2010;232(2):471-481. DOI: 10.1007/s00425-010-1183-0

Minoda A., Nagasawa K., Hanaoka M., Horiuchi M., Takahashi H., Tanaka K. Microarray profiling of plastid gene expression in a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merola*. Plant Mol. Biol. 2005;59(3):375-385. DOI: 10.1007/s11103-005-0182-1

Miyamoto T., Obokata J., Sugiura M. A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004;101(1):48-52. DOI: 10.1073/pnas.0307163101

Nagashima A., Hanaoka M., Motohashi R., Seki M., Shinozaki K., Kanamaru K., Takahashi H., Tanaka K. DNA microarray analysis of plastid gene expression in an Arabidopsis mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004;68(3):694-704. DOI:10.1271/bbb.68.694

Nakamura T., Furuhashi Y., Hasegawa K., Hashimoto H., Watanabe K., Obokata J., Sugita M., Sugiura M. Array-based analysis on tobacco plastid transcripts:preparation of a genomic microarray containing all genes and all intergeneric regions. Plant Cell Physiol. 2003a; 44(8):861-867. DOI: 10.1093/pcp/pcg101

Nakamura T., Meierhoff K., Westhoff P., Schuster G. RNA-binding properties of HCF152, an arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. Eur. J. Biochem. 2003b;270(20): 4070-4081. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03796.x

Nakamura T., Sugiura C., Kobayashi Y., Sugita M. Transcript profiling in plastid arginine *tRNA-CCG* gene knockout moss: construction of *Physcomitrella patens* plastid DNA microarray. Plant Biol. (Stuttg). 2005;7(3):258-265. DOI: 10.1055/s-2005-865620

Noordally Z.B., Ishii K., Atkins K.A., Wetherill S.J., Kusakina J., Walton E.J., Kato M., Azuma M., Tanaka K., Hanaoka M., Dodd A.N. Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. Science. 2013;339(6125):1316-1319. DOI: 10.1126/science.1230397

Notsu Y., Masood S., Nishikawa T., Kubo N., Akiduki G., Nakazono M., Hirai A., Kadowaki K. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome. Mol. Genet. Genomics. 2002;268(4):434-445. DOI: 10.1007/s00438-002-0767-1

Ogihara Y, Endo A., Kojima T., Isono K., Hanaoka M., ShiinaT., Terachi T., Utsugi S., Murata M., Mori N., Murai K., Matsuoka Y., Ohnishi Y., Tajiri H., Tsunewaki K Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum L.*) chloroplast genome: complete sequence and contig clones. Plant Mol. Biol. Rep. 2000;18:243-253. DOI: 10.1007/BF02823995

Ogihara Y., Isono K., Kojima T., Endo A., Hanaoka M., Shiina T., Terachi T., Utsugi S., Murata M., Mori N., Takumi S., Ikeo K., Gojobori T., Murai R., Murai K., Matsuoka Y., Ohnishi Y., Tajiri H., Tsunewaki K. Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. Mol. Genet. Genomics. 2002;266(5):740-746. DOI: 10.1007/s00438-001-0606-9

Ohyama K. Chloroplast and mitochondrial genomes from a liverwort, *Marchantia polymorpha* – gene organization and molecular evolution. Biosci. Biotech. Biochem. 1996;60:16-24.

Okuda K., Hammani K., Tanz S.K., Peng L., Fukao Y., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K., Small I., Shikanai T. The pentatricopeptide repeat protein OTP82 is required for RNA editing of plastid *ndhB* and *ndhG* transcripts. Plant J. 2010;61(2):339-349. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04059.x

Okuda K., Nakamura T., Sugita M., Shimizu T., Shikanai T. A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. J. Biol. Chem. 2006;281(49):37661-37667.

Opdyke J.A., Kang J.G., Storz G. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2004;186(20):6698-705. DOI: 10.1128/JB.186.20.6698-6705.2004

Peled-Zehavi H., Danon A. Translation and translational regulation in Chloroplasts. Topics in Current Genetics. Cell and Molecular Biology of Plastids. Ed. R. Bock. Berlin: Springer-Verlag, 2007;19:249-281. DOI:10.1007/978-3-540-75376-6

Pfalz J., Bayraktar O.A., Prikryl J., Barkan A. Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. EMBO J. 2009;28 (14):2042-2052. DOI: 10.1038/emboj.2009.121

Plader W., Sugiura M. The Shine-Dalgarno-like sequence is a negative regulatory element for translation of tobacco chloroplast *rps2* mRNA: an additional mechanism for translational control in chloroplasts. Plant J. 2003;34(3):377-382. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01732.x

Pogoryelov D., Reichen C., Klyszejko A.L., Brunisholz R., Muller D. J., Dimroth P., Meier T. The oligomeric state of c rings from cyanobacterial F-ATP synthases varies from 13 to 15. J. Bacteriol. 2007;189(16):5895-5902. DOI: 10.1128/JB.00581-07

Pogoryelov D., Yu J., Meier T., Vonck J., Dimroth P., Muller D.J. The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory. EMBO Rep. 2005;6(11):1040-1044. DOI: 10.1038/sj.embor.7400517

Prikryl J., Rojas M., Schuster G., Barkan A. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011;108(1):415-420. DOI: 10.1073/pnas.1012076108

Rogalski M., Ruf S., Bock R. Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. Nucl. Acids Res. 2006;34(16):4537-4545. DOI: 10.1093/nar/gkl634

Rüdinger M., Polsakiewicz M., Knoop V. Organellar RNA editing and plant-specific extensions of pentatricopeptide repeat proteins in junger manniid but not in marchantiid liverworts. Mol. Biol. Evol. 2008;25(7):1405-1414. DOI: 0.1093/molbev/msn084

Ruwe H., Castandet B., Schmitz-Linneweber C., Stern D.B. Arabidopsis chloroplast quantitative editotype. FEBS Lett. 2013;587(9):1429-1433. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.03.022

Salone V., Rudinger M., Polsakiewicz M., Hoffmann B., Groth-Malonek M., Szurek B., Small I., Knoop V., Lurin C. A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. FEBS Lett. 2007;581(22):4132-4138. DOI:10.1016/j.febslet.2007.07.075

Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 1995;270(5235):467-470. DOI:10.1126/science.270.5235.467

Schmitz-Linneweber C., Regel R., Du T.G., Hupfer H., Herrmann R.G., Maier R.M. The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: The role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. Mol. Biol. Evol. 2002;19(9):1602-1612. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004222

Schmitz-Linneweber C., Small I. Pentatricopeptide repeat proteins:

a socket set for organelle gene expression. Trends Plant Sci. 2008;13(12):663-670. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.001

Schmitz-Linneweber C., Williams-Carrier R., Barkan A. RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast PPR protein to be associated with the 5′-region of mRNAs whose translation it activates. Plant Cell. 2005;17:2791-2804. DOI: 10.1105/tpc.105.034454

Schweer J., Türkeri H., Kolpack A., Link G. Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription – recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. Eur. J. Cell Biol. 2010;89(12):940-946. DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.06.016

Sharma M.R., Wilson D.N., Datta P.P., Barat C., Schluenzen F., Fucini P., Agrawal R.K. Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007;104(49):19315-19320. DOI: 10.1073/pnas.0709856104

Shen Y., Li C., McCarty d.R., Meeley R., Tan B.-C. Embryo defective12 encodes the plastid initiation factor 3 and is essential for embryogenesis in maize. Plant J. 2013;74(5):792-804. DOI: 10.1111/tpj.12161

Shiina T., Yuichi T., Yoichi N., Khan M.S. Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. Intern. Rev. Cytol. 2005;244:1-68. DOI: 10.1016/S0074-7696(05)44001-2

Shikanai T. RNA editing in plants: Machinery and flexibility of site recognition. Biochim. Biophys Acta. 2015;1847(9):779-785. DOI: 10.1016/j.bbabio.2014.12.010

Shikanai T., Fujii S. Function of PPR proteins in plastid gene expression. RNA Biology. 2013;10(9):1446-1456. DOI: 10.4161/rna.25207

Siniauskaya M., Naydenov N., Davydenko O., Nakamura C. Macroarray for studying chloroplast gene expression profiles associated with the initial development of wheat. Proc. of the 11th Intern. Wheat Genet. Symp. Ed. R. Appels et al. 2008.

Small I.D., Peeters N. The PPR motif: a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. Trends Biochem. Sci. 2000;25(2):46-47. DOI: 10.1016/S0968-0004(99)01520-0

Staub J.M., Maliga P. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA. EMBO J. 1993;12(2):601-606.

Stern D.B., Goldschmidt-Clermont M., Hanson M.R. Chloroplast RNA metabolism. Annu. Rev. Plant Biol. 2010;61:125-155. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112242

Stock D., Leslie A.G.W., Walker J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science. 1999;86(5445):1700-1705. DOI: 10.1126/science.286.5445.1700

Stoppel R., Meurer J. Complex RNA metabolism in the chloroplast: an update on the *psbB* operon. Planta. 2013;237(2):441-449. DOI: 10.1007/s00425-012-1782-z

Stoughton R.B. Applications of DNA microarrays in biology. Annu. Rev. Biochem. 2005;74:53-82. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133212

Sugita M., Miyata Y., Maruyama K., Sugiura C., Arikawa T., Higuchi M. Extensive RNA editing in transcripts from the *PsbB* operon and *RpoA* gene of plastids from the enigmatic moss *Takakia lepidozioides*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006;70(9):2268-2274. DOI: 10.1271/bbb.60204

Sugiura M. Plastid mRNA translation Chloroplast Biotechnology. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Ed. P. Maliga. Humana Press. 2014;1132:73-90. DOI 10.1007/978-1-62703-995-6

Sugiura M., Hirose T., Sugita M. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. Annu. Rev. Genet. 1998;32:437-459. DOI: 10.1146/annurev.genet.32.1.437

Swiatecka-Hagenbruch M., Emanuel C., Hedtke B., Liere K., Börner T. Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. Nucl. Acids Res. 2008;36(3):785-792. DOI: 10.1093/nar/gkm1111

Takenaka M., Zehrmann A., Hartel B., Kugelmann M., Verbitskiy D., Brennicke A. Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012;109(13):5104-5109. DOI: 10.1073/pnas.1202452109

Takenaka M., Zehrmann A., Verbitskiy D., Härtel B., Brennicke A. RNA editing in plants and its evolution. Annu. Rev. Genet. 2013;47(13):335-352. DOI: 10.1146/annurev-genet-111212-133519

Tiller N., Bock R. The translational apparatus of plastids and its role in plant development. Mol. Plant. 2014;7(7):1105-1120. DOI: 10.1093/mp/ssu022

Tiller N., Weingartner M., Thiele W., Maximova E., Schöttler M.A., Bock R. The plastid-specific ribosomal proteins of Arabidopsis thaliana can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. Plant J. 2012;69(2):302-316. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04791.x

Toyoshima Y., Onda Y., Shiina T., Nakahira Y. Plastid transcription in higher plants. CRC Crit Rev. Plant Sci. 2005;24(1):59-81. DOI: 10.1080/07352680590910438

Tozawa Y., Teraishi M., Sasaki T., Sonoike K., Nishiyama Y., Itaya M., Miyao A., Hirochika H. The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the psaA operon in rice chloroplasts. Plant J. 2007;52(1):124-132. DOI: 10.1111/j.1365–313X.2007.03216.x

Valkov V.T., Scotti N., Kahlau S. Maclean D., Grillo S., Gray J.C., Bock R., Cardi T. Genome-wide analysis of plastid gene expression in potato leaf chloroplasts and tuber amyloplasts: transcriptional and posttranscriptional control. Plant Physiol. 2009;150(4):2030-2044. DOI: 10.1104/pp.109.140483

Verbitskiy D., van der Merwe J.A., Zehrmann A., Brennicke A., Takenaka M. Multiple specificity recognition motifs enhance plant mitochondrial RNA editing *in vitro*. J. Biol. Chem. 2008:283(36):24374-24381. DOI: 10.1074/jbc.M803292200

Wakasugi T., Tsudzuki J., Ito S., Nakashima K., Tsudzuki T., Sugiura M. Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the Black Pine *Pinus thunbergii*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994;91(21):9794-9798. DOI: 10.1073/pnas.91.21.9794

Walter M., Kilian J., Kudla J. PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3′-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts. EMBO J. 2002;21(24):6905-6914. DOI: 10.1093/emboj/cdf686

Westhoff P., Hermann R.G. Complex RNA maturation in chloroplasts: the *psbB* operon from spinach. Eur. J. Biochem. 1988;171(3):551-564. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13824.x

Wicke S., Schneeweiss G.M., dePamphilis C.W., Müller K.F., Quandt D. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. Plant Mol. Biol. 2011;76(3/5):273-297. DOI: 10.1007/s11103-011-9762-4

Williams-Carrier R., Kroeger T., Barkan A. Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. RNA. 2008;14(9):1930-1941. DOI: 10.1261/rna.1077708

Wostrikoff K., Stern D. Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007;104(15):6466-6471. DOI: 10.1073/pnas.0610586104

Xu T., Lee K., Gu L., Kim J.I., Kang H. Functional characterization of a plastid-specific ribosomal protein PSRP2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. Plant Physiol. Biochem. 2013;73:405-411. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.10.027

Yagi Y., Shiina T. Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. Front. Plant Sci. 2014;5(61):1-7. DOI: 10.3389/fpls.2014.00061

Yamaguchi K., Beligni M.V., Prieto S., Haynes P.A., McDonald W.H., Yates J.R. 3rd Mayfield S.P. Proteomic characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome. Identification of proteins unique to the 70 S ribosome. J. Biol. Chem. 2003;278(36):33774-33785. DOI: 10.1074/jbc.M301934200

Yamaguchi K., Prieto S., Beligni M.V., Haynes P.A., McDonald W.H., Yates J.R. 3rd, Mayfield S.P. Proteomic characterization of the small subunit of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome: identi-

fication of a novel S1 domain-containing protein and unusually large orthologs of bacterial S2, S3, and S5. Plant Cell. 2002;14(11):2957-2974. DOI: 10.1105/tpc.004341

Yehudai-Resheff S., Hirsh M., Schuster G. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. Mol. Cell. Biol. 2001;21(16):5408-5416. DOI:10.1128/MCB.21.16.5408-5416.2001

Zerges W., Auchincloss A.H., Rochaix J.D. Multiple translational control sequences in the 5' leader of the chloroplast *psbC* mRNA interact with nuclear gene products in Chlamydomonas reinhardtii. Genetics. 2003;163(3):895-904.

Zerges W., Girard-Bascou J., Rochaix J.D. Translation of the chloroplast psbC mRNA is controlled by interactions between its 5' leader and the nuclear loci TBC1 and TBC3 in Chlamydomonas reinhardtii. Mol. Cell Biol. 1997;17(6):3440-3448.

Zghidi W., Merendino L., Cottet A., Mache R., Lerbs-Mache S. Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the *psbN* gene in plastids. Nucl. Acids Res. 2007;35(2):455-464. DOI: 10.1093/nar/gkl1067

Zghidi-Abouzid O., Merendino L., Buhr F., M. Ghulam M., Lerbs-Mache S. Characterization of plastid *psbT* sense and antisense RNAs. Nucl. Acids Res. 2011;39(13):5379-5387. DOI: 10.1093/nar/gkr143

Zhelyazkova P. The transcriptome of barley chloroplasts revealed by deep sequencing. Dissertation. Berlin, 2012

Zhelyazkova P., Hammani K., Rojas M., Voelker R., Vargas-Suárez M., Börner T., Barkan A. Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. Nucl. Acids Res. 2012;40(7):3092-3105. DOI: 10.1093/nar/gkr1137

Zhelyazkova P., Sharma C.M., Förstner K.U., Liere K., Vogel J., Börner T. The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. Plant Cell. 2012;4(1):123-136. DOI: 10.1105/tpc.111.089441

Zmienko A., Guzowska-Nowowiejska M., Urbaniak R., Plader W., Formanowicz P., Figlerowicz M. A tiling microarray for global analysis of chloroplast genome expression in cucumber and other plants. Plant Methods. 2011;7:29. DOI: 10.1186/1746-4811-7-29

Zoschke R., Nakamura M., Liere K., Sugiura M., Börner T., Schmitz-Linneweber C. An organellar maturase associates with multiple group II Introns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107(7):3245-3250. DOI: 10.1073/pnas.0909400107

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):529-537
DOI 10.18699/VJ15.069

Определение типа цитоплазмы у растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров

Е.А. Домблидес, А.С. Домблидес, Т.В. Заячковская, Л.Л. Бондарева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, Московская область, Одинцовский р-н, пос. ВНИИССОК, Россия

Идентификация типа цитоплазмы с использованием молекулярных маркеров позволяет упростить отбор пар для скрещивания при создании гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). На 40 образцах семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) для определения типа цитоплазмы протестированы 22 пары уже известных праймеров, отобранных из литературных источников. С использованием стандартной и мультиплексной ПЦР были идентифицированы 7 различных типов цитоплазмы (*Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*, *ole*) у коллекционных образцов. Расшифровка нуклеотидной последовательности продуктов, дифференцирующих различные типы стерильности цитоплазмы, подтвердила наличие в митохондриальной ДНК (мтДНК) исследуемых стерильных образцов локусов генов *orf138*, *orf222*, *orf224*, связанных с проявлением признака ЦМС. У стерильного образца капусты пекинской в мтДНК присутствовало сразу два гена, *orf138* и *orf222*, что соответствовало типу *Ogu-NWSUAF*. У всех образцов, несущих цитоплазму *Ogura*, в мтДНК присутствовал участок 417 п. н., на 100 % гомологичный с митохондриальным геном *orf138*-тип A (всего ранее выделяли 9 типов гена *orf138* – от A до I). Исключение составил образец капусты белокочанной F1 Tekila, у которого был выявлен новый аллельный вариант гена *orf138*, характеризующийся наличием делеции в 39 п. н., но в отличие от *orf138*-тип F, для которого также характерна делеция в 39 п. н., у него присутствовали две несинонимичные замены: A→T по 95-й позиции и G→A по 99-й позиции.

Ключевые слова: Brassicaceae Burnett; митохондриальная ДНК (мтДНК); цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС); ЦМС *Ogura*; ЦМС *Ogu-NWSUAF*; *orf138*; ПЦР.

Identification of cytoplasm types in accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) with DNA markers

E.A. Domblides, A.S. Domblides, T.V. Zayachkovskaya, L.L. Bondareva

All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, Moscow oblast, Odintsovo region, VNIISSOK, Russia

Identification of cytoplasm types with the use of molecular markers enables to simplify the parent line pair selection for hybrid development based on CMS. Forty accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) were analyzed with 22 pairs of PCR primers taken from previous research. Seven types of cytoplasm (*Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*, *ole*) were observed among breeding accessions using standard and multiplex PCR technique. The sequence of PCR products that differentiated different types of sterile cytoplasm confirmed the presence of three genes, *orf138*, *orf222*, and *orf224*, in mitochondrial DNA associated with exhibition of CMS. The accession of Nappa cabbage (*Brassica rapa* Pekinensis Group) had two genes, *orf138* and *orf222*, which corresponded to cytoplasm *Ogu-NWSUAF*. All accessions carrying *Ogura* cytoplasm had the 417 bp fragment, which was 100 % identical to the mitochondrial *orf138* gene sequence corresponding to Type A (formerly nine sequence Types, from A to I, had been identified). An exception was the accession of white head cabbage Tekila F1 with a new allelic variant of *orf138* gene, which combined the 39-bp deletion typical of the Type F *orf138* sequence and two nonsynonymous substitutions, A→T and G→A, at positions 95 and 99, respectively.

Key words: Brassicaceae Burnett; mitochondrial DNA (mtDNA); cytoplasmic male sterility (CMS); CMS *Ogura*; CMS *Ogu-NWSUAF*; *orf138*; PCR.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Домблидес Е.А., Домблидес А.С., Заячковская Т.В., Бондарева Л.Л. Определение типа цитоплазмы у растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):529-537. DOI 10.18699/VJ15.069

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Domblides E.A., Domblides A.S., Zayachkovskaya T.V., Bondareva L.L. Identification of cytoplasm types in accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) with DNA markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):529-537. DOI 10.18699/VJ15.069

УДК 581.16:577.21:582.683.2
Поступила в редакцию 02.04.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: edomblides@mail.ru

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – это наследуемый по материнской линии признак, кодируемый митохондриальной ДНК, при котором растение не может производить жизнеспособную пыльцу, а фертильность женского гаметофита сохраняется. Этот признак широко используется в селекции при создании гибридов первого поколения, поскольку позволяет контролировать процесс опыления пыльцой отцовских форм. На данный момент нет четкой классификации основных типов цитоплазмы, определяющих мужскую стерильность важнейших культивируемых видов растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett). Наиболее полная классификация предложена T. Shiga в 1980 г. на основе обобщения исследований разных авторов (Shiga, 1980; Бунин, 2002). ЦМС-формы, относящиеся к определенному типу стерильности, характеризуются своим типом мтДНК и системой ядерного генетического контроля. Большинство митохондриальных генов, обусловливающих ЦМС у капустных культур, имеет химерную природу и создает новые открытые рамки считывания, такие как *orf222*, *orf224*, *orf138*, *orf125*, *orf263*, кодирующие цитотоксические белки (Tanaka et al., 2012). В зависимости от генетического происхождения стерильности, выделяют: 1) внутривидовые вариации (спонтанные мутации в митохондриальном геноме, обнаруженные *de novo*); 2) аллоплазматические стерильности, образовавшиеся в результате межвидовых и межродовых скрещиваний; 3) ЦМС, индуцированные слиянием соматических клеток (Yamagishi, Bhat, 2014). Основные, описанные в литературе, типы цитоплазмы, встречающиеся при различных типах ЦМС у культурных растений семейства Brassicaceae Burnett, – *Ogura* (несколько типов), *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap*, *tour/jun*.

ЦМС типа *Ogura* является одной из самых распространенных и наиболее часто использующихся для производства гибридов F_1 у сельскохозяйственных культур семейства Brassicaceae во всем мире. Этот тип ЦМС был описан Х. Огурой (Ogura, 1968) у неидентифицированного сорта японского подвида *R. sativus* L. – дайкона. Было установлено, что данный тип стерильности индуцируется при взаимодействии гомозиготного ядерного гена $rf_{og}rf_{og}$ и стерильной цитоплазмы *Ogura* (*ogu*). Сорта дайкона, распространенные в Японии, отличаются от этой стерильной формы не только наличием нормальной цитоплазмы (*rad* или *rap*), но и отсутствием доминантных генов-восстановителей фертильности ($Rf_{og}Rf_{og}$), в отличие от европейских сортов *R. sativus*, в которых они часто встречаются (Бунин, 2002). Позже была проведена целая серия скрещиваний стерильного дайкона с редисами, относящимися к европейскому подвиду *R. sativus*, позволившая получить гибриды редиса F_1 на основе цитоплазмы *Ogura* (Bonnet, 1977). Кроме того, цитоплазма *Ogura* была успешно перенесена в растения рода *Brassica*, относящиеся к видам *B. oleraceaea*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. juncea*, посредством межродовых скрещиваний и серий последующих беккроссов (Bannerot et al., 1974; Heyn, 1976). Методом слияния протопластов были получены гибриды с улучшенными характеристиками ЦМС (*ogu-INRA*), у которых отсутствовали недостаток хлорофилла и низкая секреция нектара (Pelletier et al., 1983). В результате изучения гена *orf138*, ответственного за проявление стерильности *Ogura*, было выделено 9 его вариантов, обозначенных от A до I (англ.), включая *orf138*-тип F, для которого характерна делеция 39 п. н. Этот тип еще называют *Kosena* (по названию сорта редиса, из которого выделили стерильную линию *kos* CMS) (Yamagishi, Terachi, 2001). Рапс с цитоплазмой *Kosena* был получен из гибридов между *R. sativus kos* CMS и *B. napus* сорта Wester (Sakai, Imamura, 1994).

Еще одним распространенным типом ЦМС у капустных культур является *Polima*-ЦМС (*pol* CMS). Этот тип стерильности был обнаружен и описан у одноименного польского сорта рапса в 1972 г. (Fu, 1981). *Pol* CMS стерильные линии по чувствительности проявления мужской стерильности к температуре делят на три типа: высокотемпературные, низкотемпературные и стабильные ЦМС-линии. В соответствии с этим для получения гетерозисных гибридов на основе *pol*-цитоплазмы используют как трехлинейную, так и двухлинейную схему (Yang et al., 1995). Тип *Shaan 2A* CMS, обнаруженный в 1976 г. в потомстве от скрещиваний селекционных линий рапса китайского происхождения (Li, 1980), в отличие от описанной ранее *pol* CMS, характеризовался стабильным проявлением полной мужской стерильности. Последующее молекулярное изучение подтвердило идентичность цитоплазмы *Shaan 2A* и *Polima*. У обоих типов выделялся ассоциированный с ЦМС *orf224/atp6* локус мтДНК, отличающийся только одним нуклеотидом по 398-й позиции (A→G) и, соответственно, одной аминокислотой (Asn→Ser) (Wang et al., 2002). Использование метода слияния протопластов позволило перенести цитоплазму *Polima* от стерильных растений рапса в брокколи (Yarrow et al., 1990), а посредством межвидовых скрещиваний – в капусту китайскую *B. rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt (Hu, 1997).

Nap-ЦМС известна еще как Shiga–Thompson ЦМС система, названная так по фамилиям авторов, описавших ее в потомстве сортовой популяции европейского (Thompson, 1972) и японского рапса (Shiga, Baba, 1973). Большинство сортов рапса содержат *nap*-цитоплазму, но они фертильны, так как несут ген-восстановитель для *nap*-ЦМС. Стерильные растения при повышенной температуре воздуха (более 30 °C) и на поздних этапах цветения могут формировать жизнеспособную пыльцу, что ограничивает широкое использование этой системы ЦМС. Проявление этого типа цитоплазмы связано с экспрессией *orf222/nad5c/orf139* региона мтДНК. Расшифровка нуклеотидной последовательности *orf222* показала 79 % сходства с *orf224*, однако расположение в мтДНК этих двух локусов различается (L'Homme et al., 1997).

У рапса был описан тип стерильности *Ogu-NWSUAF*, характеризующийся присутствием в мтДНК сразу двух маркерных генов, *orf138* и *orf222*. Этот тип отличается большой стабильностью проявления ЦМС, отсутствием хлороза и хорошей завязываемостью семян (Zhao et al., 2010).

Еще один тип, вызывающий ЦМС у представителей семейства Капустные, – цитоплазма *tour*. Иногда его называют *jun*-цитоплазма или *Anand*-цитоплазма. Эта встречающаяся в природе аллоплазматическая ЦМС произошла от вида *B. tournefortii* (Pradhan et al., 1991) и впервые была описана у *B. juncea* (Rawat, Anand, 1979).

Растения при типе ЦМС *tour* имеют в мтДНК открытую рамку считывания (*orf263*) в 3′ регионе гена *atp6* (Landgren et al., 1996).

Кроме типов цитоплазмы, вызывающих стерильность, выделяют и типы цитоплазмы, характерные для фертильных образцов различных видов, такие как *cam*, *rad/rap*, *ole*. Эти типы необходимо диагностировать для правильного подбора пар для скрещивания при создании гетерозисных гибридов на основе ЦМС.

Классическим методом определения типа цитоплазмы у капустных культур является проведение анализирующих скрещиваний (тест-кроссы) в течение нескольких лет. Развитие методов ДНК маркирования позволило сделать процесс идентификации более точным и быстрым, поэтому целью исследований являлся подбор маркеров ДНК для эффективного метода ПЦР определения основных типов цитоплазмы в генетической коллекции капустных культур при получении гибридов на основе ЦМС.

Материалы и методы

Растительный материал. Исследование проводилось на фертильных и стерильных образцах семейства Капустные (табл. 1).

Выделение ДНК. Из молодых листьев и/или бутонов экстрагировали ДНК с использованием набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» («Синтол», Россия). ДНК выделялась из индивидуальных растений, кроме фертильных образцов, представляющих собой сортопопуляции, для которых составлялась выборка, объединяющая ДНК, полученную из 8–10 индивидуальных растений каждого образца в равных количествах (суммарный препарат ДНК).

Амплификация ДНК. Использовали метод стандартной и мультиплексной ПЦР. Из литературных источников было отобрано 22 пары праймеров (табл. 2). Все праймеры синтезированы компанией «Синтол» (Россия).

ПЦР проводилась в объеме 25 μl, включая 1× ПЦР буфер Б, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 mM каждого dNTP, 0,3 μM каждого праймера, 1,5 единиц SynTaq ДНК-полимеразы («Синтол», Россия) и 3 μl ДНК. Первоначально ПЦР выполняли при условиях, описанных в литературных источниках (табл. 2), на амплификаторе BioRad C1000 Touch («BioRad», США). Для некоторых праймеров изменяли $T_{отж}$, чтобы освободиться от неспецифических продуктов амплификации.

Продукты амплификации разделяли в 1,7 %-м агарозном геле в 0,5 × TBE-буфере. Полученные гели окрашивали раствором бромистого этидия и фотографировали с помощью системы гель-документации «ChemiDoc XRS+» («BioRad», США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс GeneRuler100 bp Plus DNA Ladder («Thermo scientific»).

Секвенирование продуктов амплификации, полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1, P11 и P12, P21 и P22, P21 и P32, nap-5 и nap-3, TRNAFM-F и TRNAFM-R, TRNAFM-F и Orf138-R, проводили в научно-производственной компании «Синтол» (Москва, Россия). Для этого фрагменты геля с характерными видимыми полосами вырезали, ДНК из них элюировали, очищали и использовали в качестве матрицы для реамплификации. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130XL» («Applied Biosystems Inc.», США). Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей проводили по базе NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Результаты и обсуждение

Для внутреннего контроля присутствия в суммарных препаратах ДНК митохондриальной ДНК использовали пару праймеров – atp9-5′ и atp9-3′. Эти праймеры являются специфичными для гена *atp9*, который присутствует в митохондриальном геноме у всех видов растений семейства Brassicaceae (Motegi et al., 2003). Ампликоны размером 200 п. н. присутствовали во всех образцах, подтверждая наличие мтДНК в суммарных препаратах ДНК.

Тип цитоплазмы *Ogura*

Для идентификации цитоплазмы типа *Ogura* использовали 13 пар праймеров (табл. 2). Маркерные фрагменты присутствовали у стерильных образцов капусты белокочанной, брокколи, капусты пекинской, капусты китайской, редиса и стерильного образца дайкона (используется в скрещиваниях в качестве донора стерильности *Ogura*). Необходимо отметить, что у фертильных образцов редиса гибридного происхождения, полученных при скрещивании со стерильными материнскими формами, маркерные фрагменты цитоплазмы *Ogura* амплифицировались с такой же интенсивностью, как и у стерильных образцов. Это свидетельствует о наличии у образцов цитоплазмы *Ogura* (табл. 1), однако отсутствие внешнего проявления стерильности обусловлено присутствием в ядерном геноме генов-восстановителей фертильности (*Rf*), которые достаточно часто встречаются у сортов европейского подвида редиса.

В основной конфигурации митохондриального генома *orf138* локализован между генами *tRNAfM* и *orfB* (Bellaoui et al., 1998). В связи с этим мы включили в исследование и протестировали праймеры, амплифицирующие данные участки мтДНК. Праймеры TRNAFM-F и TRNAFM-R амплифицируют фрагмент 398 п. н. локуса гена *tRNAfM*, а праймеры orfBF и orfBR, orfBF′ и $orfBR_2$, P_6^+(orfB) и P_6^-(orfB) амплифицируют участок митохондриального генома, несущего ген *orfB* (*atp 8*). У всех исследуемых образцов амплификация с праймерами orfBF и orfBR прошла с одинаковой интенсивностью, соответственно, этот ген присутствует и в фертильных, и в стерильных растениях. При амплификации с парой праймеров orfBF′ и orfBR2 продукт 520 п. н. не обнаружен, однако выявлены различия между образцами, относящимися к разным родам. У всех образцов рода *Brassica* (фертильных и стерильных) выявлялся фрагмент размером около 400 п. н., отсутствующий у всех образцов рода *Raphanus*.

В литературе опубликована пара праймеров P_6^+(orfB) и P_6^-(orfB), амплифицирующих участок мтДНК гена *orfB*, различающийся по размеру у стерильных растений капусты цветной (фрагмент размером 300 п. н.) и у линии-закрепителя стерильности NKC-B (фрагмент размером 600 п. н.) (Wang et al., 2006). Маркерный фрагмент 300 п. н. присутствовал у тестируемых образцов с цитоплазмой *Ogura*, однако фрагмент размером 600 п. н.

Таблица 1. Идентифицированный тип цитоплазмы образцов семейства Brassicaceae Burnett

Латинское название	№	Название образца	Происхождение	Кол-во растений		Диагностированный тип цитоплазмы
				S	F	
B. oleracea L. convar. *Capitata* (L.) Alef. var. *capitata* L. f. *alba DC*	1	Слава 1305	сорт ВНИИССОК	0	сум	*ole*
	2	Амагер 611	сорт ВНИИССОК	0	сум	*ole*
	3	Стахановка 1513	сорт ВНИИССОК	0	сум	*ole*
	4	Парус	сорт ВНИИССОК	0	сум	*ole*
	5	Tekila F1	к/о, Syngenta	2	0	*Ogura*, *orf138/orf125**
	6	S-1	с/о, ВНИИССОК	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	7	s-4	с/о, ВНИИССОК	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	8	s-10	с/о, ВНИИССОК	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	9	182-13	г/к, ВНИИССОК	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	10	241-13	г/к, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	11	261-1	г/к, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	12	51-10	г/к, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	13	323-10	г/к, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	14	30-13	г/к, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
B. oleracea L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *italica* Plenck.	15	Тонус	сорт ВНИИССОК	0	сум	*ole*
	16	1703-2	с/о, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	17	1707-1	с/о, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	18	1709-1	с/о, ВНИИССОК	1	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
B. rapa L. ssp. chinensis (L.) Hanelt	19	Ласточка	сорт ВНИИССОК	0	сум	*cam*
	20	Веснянка	сорт ВНИИССОК	0	сум	*cam*
	21	4-13	с/о, ВНИИССОК	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
B. rapa L. em Metzg. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt	22	Хибинская	к/о, ГНУ ВИР	0	сум	*cam*
	23	9-07	с/о, ВНИИССОК	3	0	*Ogu-NWSUAF*, *orf138*-тип *A*, *orf222*
B. juncea (L.) Czern.	24	Волнушка	сорт ВНИИССОК	0	сум	*cam*
	25	Прима	к/о, ГНУ ВИР	0	сум	*cam*
B. napus ssp. *Oleifera* Metzg. f. *annua*	26	к-4512 Tira MS	к/о, ГНУ ВИР	0	5	*napus*, *orf222*
	27	BC1 (Regent A×V 36-13)	к/о, ГНУ ВИР	1	4	F – *napus*, *orf222* S – *polima*, *orf224*
	28	к-5099 Line Rf	к/о, ГНУ ВИР	0	5	*polima*, *orf224*
R. sativus L. ssp. *acanthiformis* (Morel) Stankev	29	MS-Gensuke	к/о, Япония	4	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	30	Ushiki-Gensuke	к/о, Япония	0	4	*rad*
R. sativus L. convar. *radicula* (Pers.) Sazonova	31	Ария	сорт ВНИИССОК	0	сум	*rad*
	32	Фея	сорт ВНИИССОК	0	сум	*rad*
	33	Моховский	сорт ВНИИССОК	0	сум	*rad*
	34	Donar F1	к/о, Syngenta	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	35	Tarzan F1	к/о, Enza Zaden	3	0	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	36	118-10	г/к, ВНИИССОК	3	3	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	37	145-10	г/к, ВНИИССОК	2	2	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	38	486-11	г/к, ВНИИССОК	3	3	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	39	444-13	г/к, ВНИИССОК	2	2	*Ogura*, *orf138*-тип *A*
	40	D-68-13	г/к, ВНИИССОК	2	2	*Ogura*, *orf138*-тип *A*

S – стерильные растения, F – фертильные растения, с/о – селекционный образец, г/к – гибридная комбинация, к/о – коллекционный образец, сум – суммарный препарат ДНК, *orf138/orf125** – новый аллельный вариант.

Таблица 2. Тестируемые праймеры

Название праймера	$T_{отж}$(°C)/$T_{отж}$(°C)	Размер ампликона	Тип цитоплазмы	Литературный источник
138Xba 138Eco	60	~ 300	*Ogura*	Yamagishi, Glimelius, 2003
Orf138-F1 Orf138-R	58	512	*Ogura*	Giancola et al., 2007
Orf138-F2 OrfB-R1	51/58*	788	*Ogura*	Giancola et al., 2007
ogu-5′ ogu-3′	52/60*	600	*Ogura*	Motegi et al., 2003
orf138-5′ orf138-3′	60	517	*Ogura*	Motegi et al., 2003
Og-1 Og-2	46/58*	~ 520	*Ogura*	Карлов, 2010
F R	57	780	*Ogura*	Niemela et al., 2010
P11 P12	54	465	*Ogura*	Zhao et al., 2010
orfBF orfBR	58	~ 1 000	*Ogura*	Yamagishi, Glimelius, 2003
orfBF′ orfBR2	52/55*	520	*Ogura*	Giancola et al., 2007
$P_б^+$(orfB) $P_б^-$(orfB)	53/55*	300-s 600-m	*Ogura*	Wang et al., 2006
TRNAFM-F TRNAFM-R	54	398	*Ogura*	Giancola et al., 2007
TRNAFM-F Orf138-R	54	800	*Ogura*	Giancola et al., 2007
nap-5 nap-3	52/60*	500	*napus*	Motegi et al., 2003
P21 P22	54	1,102	*napus*	Zhao et al., 2010; Wei et al., 2005
pol-5′ pol-3′	52/55*	550	*polima*	Motegi et al., 2003
Orf224f Orf224r	60/58*	600	*polima*	Wang et al., 2006
P21 P32	54	747	*polima*	Zhao et al., 2010; Wei et al., 2005
rad-5′ rad-3′	60	500	Нормальный редис	Motegi et al., 2003
FATP6 RORF263	53	866 1 021-m	*tour/jun*	Dieterich, 2002
FORF263 RORF263	53	350	*tour/jun*	Dieterich, 2002
atp9-5′ atp9-3′	60	200	Контроль мтДНК	Motegi et al., 2003

$T_{отж}$ – температура отжига; * – подобранная нами температура отжига праймера; s – у стерильной формы; m – у закрепителя.

отсутствовал у закрепителя стерильности дайкона образца Ushiki-Gensuke.

Таким образом, из 13 протестированных пар праймеров только 11 можно рекомендовать для идентификации типа цитоплазмы *Ogura* у образцов семейства Brassicaceae, выбирая наиболее удобную пару (по $T_{отж}$ и размеру амплифицированного фрагмента).

Как уже упоминалось, митохондриальный ген *orf138* известен как маркерный ген цитоплазмы типа *Ogura* и используется для характеристики этого типа ЦМС.

```
                                        20                                  40                                  60
                                         |                                   |                                   |
AB055435_orf138A  ATGATTACCT  TTTTCGAAAA  ATTGTCCACT  TTTTGTCATA  ATCTCACTCC  TACTGAATGT  AAAGTTAGTG  70
        Tekila_F1  ATGATTACCT  TTTTCGAAAA  ATTGTCCACT  TTTTGTCATA  ATCTCACTCC  TACTGAATGT  AAAGTTAGTG  70
AB055440.1_orf138F  ATGATTACCT  TTTTCGAAAA  ATTGTCCACT  TTTTGTCATA  ATCTCACTCC  TACTGAATGT  AAAGTTAGTG  70
                          80                                 100                                 120                                 140
                           |                                   *    *|                                  |                                   |
AB055435_orf138A  TAATAAGTTT  CTTTCTTTTA  GCTTTTTTAC  TAATGGCCCA  TATTTGGCTA  AGCTGGTTTT  CTAACAACCA  140
        Tekila_F1  TAATAAGTTT  CTTTCTTTTA  GCTTTTTTAC  TAATGGCCCA  TATTTGGCTA  AGCTGGTTTT  CTAACAACCA  140
AB055440.1_orf138F  TAATAAGTTT  CTTTCTTTTA  GCTTATTTGC  TAATGGCCCA  TATTTGGCTA  AGCTGGTTTT  CTAACAACCA  140
                                        160                                 180                                 200
                                         |                                   |                                   |
AB055435_orf138A  ACATTGTTTA  CGAACCATGA  GACATCTAGA  GAAGTTAAAA  ATTCCATATG  AATTTCAGTA  TGGGTGGCTA  210
        Tekila_F1  ACATTGTTTA  CGAACCATGA  GACATCTAGA  GAAGTTAAAA  ATTCCATATG  AATTTCAGTA  TGGGTGGCTA  210
AB055440.1_orf138F  ACATTGTTTA  CGAACCATGA  GACATCTAGA  GAAGTTAAAA  ATTCCATATG  AATTTCAGTA  TGGGTGGCTA  210
                          220                                 240                                 260                                 280
                           |                                   |                                   |                                   |
AB055435_orf138A  GGTGTCAAAA  TTACAATAAA  ATCAAATGTA  CCTAACGATG  AAGTGACGAA  AAAAGTCTCA  CCTATCATTA  280
        Tekila_F1  GGTGTCAAAA  TTACAATAAA  ATCAAATGTA  CCTAACGATG  AAGTGACGAA  AAAAGTCTCA  CCTATCATTA  280
AB055440.1_orf138F  GGTGTCAAAA  TTACAATAAA  ATCAAATGTA  CCTAACGATG  AAGTGACGAA  AAAAGTCTCA  CCTATCATTA  280
                                        300                                 320                                 340
                                         |                                   |                                   |
AB055435_orf138A  AAGGGGAAAT  AGAGGGGAAA  GAGGAAAAAA  AAGAGGGGAA  AGGGGAAATA  GAGGGGAAAG  AGGAAAAAAA  350
        Tekila_F1  AAGGGGAAAT  AGAGGGGAAA  GAGGAAAAAA  AAGAGGGGAA  AGGGGAAATA  GAGGGGAAAG  AGGAAAAAAA  350
AB055440.1_orf138F  AAGGGGAAAT  AGAGGGGAAA  GAGGAAAAAA  AAGAGGGGAA  AGGGGAAATA  GAGGGGAAAG  AGGAAAAAAA  350
                          360                                 380                                 400
                           |                                   |                                   |
AB055435_orf138A  AGAGGGGAAA  GGGGAAATAG  AGGGGAAAGA  GGAAAAAAAA  GAGGTGGAAA  ATGGACCGAG  AAAATAA  417
        Tekila_F1  AGAGG ëëëëë  ëëëëëëëëëë  ëëëëëëëëëë  ëëëëëëëëëë  ëëëëTGGAAA  ATGGACCGAG  AAAATAA  378
AB055440.1_orf138F  AGAGG ëëëëë  ëëëëëëëëëë  ëëëëëëëëëë  ëëëëëëëëëë  ëëëëTGGAAA  ATGGACCGAG  AAAATAA  378
```

Рис. 1. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена *orf138*-тип A (AB055435 база данных NCBI) и *orf138*-тип F (AB055440.1 база данных NCBI) с образцом капусты белокочанной F1 Текила. Позиции нуклеотидов 95 и 99 отмечены звездочками.

Ранее было выделено 9 типов гена *orf138*, обозначаемых от A до I (англ.) у образцов *R. sativus* (Yamagishi, Terachi, 2001). Нами была произведена расшифровка последовательности продуктов размером 788 п. н. (полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1), 465 п. н. (полученных с праймерами P11 и P12) у стерильных образцов редиса, дайкона, капусты белокочанной, брокколи, капусты пекинской, которая подтвердила наличие в них участка 417 п. н. на 100 % гомологичного с митохондриальным геном *orf138*-тип A (база данных NCBI www.ncbi.nlm.gov). Несмотря на то, что имеющиеся в нашей коллекции образцы имели стерильность разного происхождения (обнаруженная спонтанно в популяции – образцы 6, 7, 8, 21, 23; переданная в результате скрещиваний между разновидностями – образцы 16, 17, 18, 36, 37, 38 и внутривидовых скрещиваний – образцы 9, 10, 11, 12, 13, 14, 39, 40, а также коллекционных образцов зарубежной селекции – образцы 29, 34, 35), у всех исследованных стерильных образцов эта последовательность была абсолютно идентичной, за исключением образца № 5 капусты белокочанной F1 Текила. У этого образца данная нуклеотидная последовательность имела делецию в 39 п. н. Близкий к этому типу тип стерильности *Kosena* (*kos*CMS) имеет митохондриальный ген *orf125*, являющийся аналогом *orf138*-тип F с делецией в 39 п. н., однако у образца капусты белокочанной F1 Текила был *orf138*-тип A, но с делецией в 39 п. н., т. е. было отличие по двум нуклеотидам в 95-й и 99-й позиции (рис. 1). Это можно рассматривать как новый аллельный вариант гена *orf138*.

Тип цитоплазмы *Napus* (*nap*)

Для идентификации цитоплазмы типа *Napus* использовали две пары праймеров, nap-5 и nap-3, а также P21и P22. При амплификации ДНК с парой праймеров, nap-5 и nap-3, которая является специфичной для митохондриального гена *atp6* при *nap*-ЦМС (*B. napus*) типе цитоплазмы (Motegi et al., 2003) во всех образцах (как стерильных, так и фертильных), относящихся к роду *Brassica*, синтезировался описанный фрагмент размером около 550 п. н. У образцов, относящихся к *R. sativus*, данный фрагмент отсутствовал. Поскольку фрагмент 550 п. н. обнаруживался как у стерильных, так и фертильных образцов рода *Brassica*, то он не может рассматриваться как достоверный при определении типа стерильности, что согласуется с данными, полученными Г.И. Карловым (2010), и его можно рассматривать только как родоспецифичный маркер.

Пара праймеров P21и P22 является специфичной для гена *orf222* (Wei et al., 2005). Маркерный фрагмент размером 1 102 п. н. был обнаружен у стерильных растений капусты пекинской образца № 23, у всех растений рапса образца № 26 и у всех фертильных растений рапса образца № 27. У всех остальных тестируемых образцов наблюдался фрагмент размером 500 п. н., присутствующий при типах *ogu*-ЦМС, *pol*-ЦМС, *cam*-, *ole*- и *rad*-цитоплазме. Для дифференцировки всех этих типов необходимо использовать еще дополнительные маркеры.

Произведенная расшифровка продукта размером 1 102 п. н., полученного с праймерами P21и P22, подтвердила присутствие *orf222* в изученных стерильных растениях капусты пекинской образца № 23, растениях рапса образца № 26 и у фертильных растений рапса образца № 27.

Отметим также, что поскольку у капусты пекинской образца № 23 в митохондриальном геноме присутствует сразу два митохондриальных гена, *orf138* и *orf222*, то это будет соответствовать типу стерильности *Ogu-NWSUAF*, а тип цитоплазмы *nap* был идентифицирован лишь у образца рапса № 26 и у фертильных растений образца № 27 (табл. 1).

Тип цитоплазмы *Polima*

Для идентификации цитоплазмы типа *Polima* использовали три пары праймеров: pol-5′ и pol-3′, Orf224f и Orf224r, P21 и P32.

При описанных в литературе условиях амплификации для пары праймеров pol-5′ и pol-3′, которая является специфичной для митохондриального гена *atp6* при *pol*-ЦМС типе цитоплазмы (Motegi et al., 2003), фрагмент ДНК размером 550 п. н. амплифицировался только у стерильного растения образца рапса № 27 и у всех растений образца рапса № 28. Соответственно, изучаемые растения имеют тип цитоплазмы *Polima*. Отсутствие внешнего проявления стерильности у растений рапса образца № 28 объясняется присутствием в их ядерном геноме генов-восстановителей фертильности *RfpRfp*, а присутствие фертильных растений у рапса образца № 27 (ранее мы у них диагностировали тип цитоплазмы *napus*), возможно, связано с невыравненностью образца и загрязнением селекционного материала. У всех остальных образцов, относящихся к роду *Brassica*, с этой парой праймеров амплифицировался минорный фрагмент размером 600 п. н.

Праймеры P21 и P32, которые являются специфичными для гена *orf224*, обусловливающего *Polima*-ЦМС (Wei et al., 2005; Wang et al., 2006), амплифицировали фрагмент 747 п. н. у тех же образцов, что и праймеры pol-5′ и pol-3′, подтверждая тип цитоплазмы *Polima*.

Не было обнаружено продуктов при амплификации ДНК всех исследуемых растений с праймерами Orf224f и Orf224r при температуре отжига 60 °C, однако при температуре 58 °C у всех образцов, относящихся к роду *Brassica*, с этой парой праймеров амплифицировался фрагмент размером 600 п. н. То есть использование данной пары праймеров для диагностики типа цитоплазмы *Polima* невозможно.

В соответствии с расшифровкой нуклеотидной последовательности фрагмента, полученного с праймерами P21 и P32 размером 747 п. н., был выявлен участок размером 675 п. н., полностью гомологичный *orf224* (GenBank accession number for orf224 Polima CMS EU254235), что подтвердило тип цитоплазмы *Polima* у растений рапса образца № 28 и стерильного растения рапса образца № 27.

Тип цитоплазмы *tour*

Праймеры FORF263 и RORF263, FATP6 и RORF263 были сконструированы на основе опубликованной в базе данных последовательности *orf263* и использовались при изучении различных типов стерильной цитоплазмы у *B. napus* (Dieterich, 2002). Несмотря на то что в нашей коллекции не было стерильных растений горчицы, для которых мог быть характерен тип стерильности цитоплазмы *tour*, мы протестировали эти праймеры на наших образцах, куда включили и два сорта горчицы сарептской. Фрагмент размером 350 п. н. присутствовал у всех образцов, а фрагмент 866 п. н. обнаруживался только у фертильных образцов рода *Raphanus*. Фрагмент 1 021 п. н., характерный для закрепителя стерильности при типе ЦМС *tour* (Dieterich, 2002), у образцов отсутствовал. Данные праймеры оказались неинформативными для диагностики типа цитоплазмы.

Тип цитоплазмы *rad*

Для ПЦР-анализа на тип цитоплазмы *rad* нормального редиса использовали пару праймеров rad-5′ и rad-3′ (Motegi et al., 2003). Известно, что тип ЦМС *Ogura* был передан культурным видам рода *Brassica* и европейскому редису от дайкона. У стерильных образцов с ЦМС *Ogura* рода *Raphanus* было обнаружено отличие по генам мтДНК от образцов с нормальным типом цитоплазмы, выявляемое праймерами rad-5′ и rad-3′ (Motegi et al., 2003). У образцов с нормальным типом цитоплазмы обнаруживался фрагмент размером 500 п. н., отсутствующий у стерильных образцов с ЦМС *Ogura*. В нашем эксперименте данный фрагмент присутствовал у фертильного образца дайкона (закрепителя стерильности) и отсутствовал у стерильного. У образцов редиса такой четкой закономерности не наблюдалось, так как у некоторых стерильных образцов данный фрагмент также обнаруживался. У фертильных и стерильных образцов, относящихся к роду *Brassica*, данного фрагмента обнаружено не было. Этот маркер оказался родоспецифичным для образцов *Raphanus*.

Тип цитоплазмы *ole*

Этот тип цитоплазмы характерен для фертильных растений, относящихся к *B. oleraceae.* Нам не удалось найти в литературе специфических праймеров на тип цитоплазмы *ole*. Однако его наличие можно предположить у тех фертильных образцов (табл. 1), у которых будут отсутствовать маркеры на типы цитоплазмы *Ogura*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap* и будут присутствовать описанные нами родоспецифичные для *Brassica* маркеры с праймерами nap-5 и nap-3 (550 п. н.), pol-5′ и pol-3′(600 п. н.), Orf224f и Orf224r (600 п. н.).

Мультиплексная ПЦР

В 2010 г. Zhao с коллегами предложили способ идентификации типа цитоплазмы у образцов рапса с использованием мультиплексной ПЦР. Этот метод позволял идентифицировать у *B. napus* сразу 5 типов цитоплазмы: *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *Nap*, *Pol*, *Cam*. Комбинация продуктов, полученных с использованием одновременно трех пар праймеров (P11 и P12, P21 и P22, P21 и P32) размером 465 и 500 п. н., была специфична для образцов с типом цитоплазмы *Ogura*, 747 и 500 п. н. – для типа цитоплазмы *Polima*, 1 102 и 800 п. н. – для типа цитоплазмы *Napus*, 800 и 500 п. н. – для типа цитоплазмы *Cam*, а 465 и 1 102 п. н. – для типа *Ogu-NWSUAF* (Zhao et al., 2010). При использовании мультиплексной ПЦР был идентифицирован тип стерильности *Ogura* ЦМС у стерильных образцов капусты белокочанной, капусты китайской, дайкона, редиса и тип ЦМС *Ogura-NWSUAF* – у стерильного образца № 9-07 капусты пекинской (рис. 2). У фертильных образцов капусты пекинской, капусты китайской, горчицы был определен тип цитоплазмы *cam.* У фертильных образцов рапса № 26 и 27 был тип цитоплазмы *nap*, а у рапса № 28 и стерильного растения образца рапса № 27 был диагностирован тип цитоплазмы *pol.* Эти данные подтвердили идентифицированные ранее типы у образцов с использованием стандартной ПЦР и позволили выделить образцы с типом цитоплазмы *cam* (табл. 1). Таким образом, ранее разработанная для рапса мультиплексная

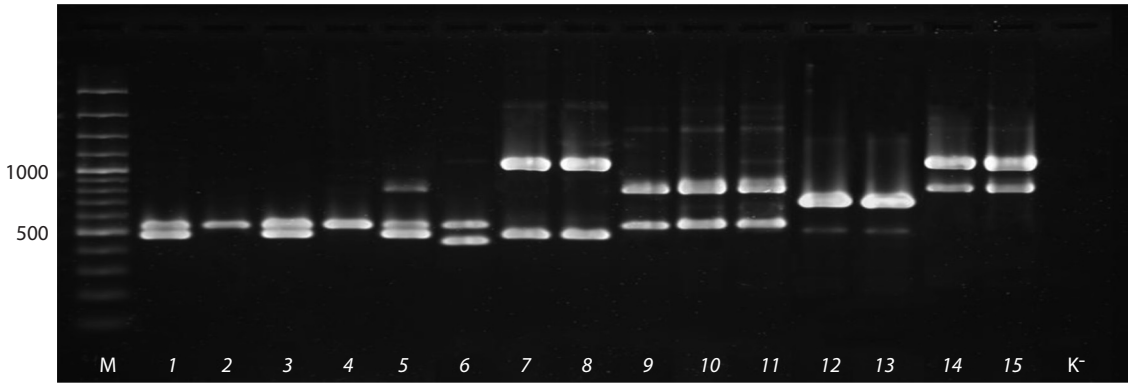


Рис. 2. Мультиплексная ПЦР. Образцы: *1* – MS-Gensuke; *2* – Ushiki-Gensuke; *3* – Donar F1; *4* – Ariya; *5* – 4-13; *6* – Tekila F1; *7* – 9-07; *8* – 9-07; *9* – Khibinskaya; *10* – Lastochka; *11* – Volnushka; *12* – BC1 (Regent A×V 36-13)-sterile; *13* – к-5099 Line Rf; *14* – BC1 (Regent A×V 36-13)-fertile; *15* – к-4512 Tira (MS); K⁻ – отрицательный контроль.

ПЦР подходит для диагностики типа цитоплазмы и для других видов семейства Капустные.

В результате проведенной работы у тестируемых образцов семейства Brassicaceae были определены 7 различных типов цитоплазмы: *Ogura*, *Ogura-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap*, *ole.* Расшифровка нуклеотидной последовательности продуктов, полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1 и P11 и P12, показала, что у всех стерильных образцов с типом ЦМС *Ogura* в мтДНК присутствовал фрагмент 417 п. н., соответствующий гену *orf138*-тип A, за исключением образца капусты белокочанной F1 Tekila, у которого имелась делеция в 39 п. н. Этот тип гена *orf138* ранее не был описан в литературе, поскольку делеция в 39 п. н. наблюдалась при типе стерильности *Kosena* (*kos* CMS), а ассоциированный с ним митохондриальный ген *orf125* (или *orf138*-тип F) являлся аналогом *orf138*-тип C, а не *orf138*-тип A, как в расшифрованной новой последовательности, т. е. имеется отличие по двум нуклеотидам: A→T по 95-й позиции и G→A по 99-й позиции. Создание новых стерильных линий на основе этого типа цитоплазмы представляет селекционный интерес также и потому, что образец капусты белокочанной F1 Tekila является еще и донором устойчивости к киле *Plasmodiophora brassicae* Woronin. У стерильного образца капусты пекинской выявлен тип цитоплазмы *Ogura-NWSUAF*, который характеризуется присутствием в мтДНК одновременно двух химерных генов – *orf138* и *orf222.* Использование этого типа цитоплазмы и передача его посредством межвидовой и внутривидовой гибридизации другим видам и разновидностям позволят обогатить генетический потенциал источников для создания гибридов. Необходимо вовлекать в селекционный процесс образцы с различными типами цитоплазмы, так как известно, что создание гибридов на основе только одного типа стерильности может приводить к снижению устойчивости к болезням и вредителям и, как следствие, – к снижению урожайности (Aldrich et al., 1977; Liu et al., 2012).

Анализ полученных результатов, а также данных, опубликованных другими исследователями, свидетельствует о сложной природе наследования и проявления признака ЦМС и о целесообразности дальнейших исследований по разработке современных методов на основе ПЦР, которые позволят помочь селекционерам проводить качественный отбор селекционного материала для создания гибридов на основе ЦМС. Для первоначального скрининга имеющегося селекционного материала капустных культур мы предлагаем использовать метод мультиплексной ПЦР. Далее для подтверждения определенного типа цитоплазмы можно проводить стандартную ПЦР с одной парой праймеров на обнаруженный тип цитоплазмы с последующей расшифровкой маркерного фрагмента для более точного определения подтипа. Кроме определения типа цитоплазмы, необходимы молекулярные маркеры для идентификации ядерных генов-восстановителей фертильности (*Rf*), в этом случае удастся создать эффективную схему отбора стерильных линий, линии-закрепителя стерильности и линии-восстановителя фертильности на основе ПЦР для капустных культур.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бунин М.С. Новые овощные культуры России. М.: Росинформагротех, 2002.

Карлов Г.И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: Автореф. дис. … д-ра биол. наук. М., 2010.

Aldrich H.C., Gracen V.E., York D., Earle E.D., Yoder O.C. Ultrastructural effects of Helminthosporium maydis race T toxin on mitochondria of corn roots and protoplasts. Tissue Cell. 1977;9(1):167-177.

Bannerot H., Boulidard Y., Temp J. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to Brassica oleraceae. Proc. EUCARPIA Meeting Cruciferae. Dundee, 1974.

Bellaoui M., Martin-Canadell A., Pelletier G., Budar F. Low-copynumber molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. Mol. Gen. Genet. 1998;257:177-185.

Bonnet A. Breeding in France of a radish hybrid obtained bybuse of cytoplasmic male sterility. Eucarpia Cruciferae Newslett. 1977;2:5-6.

Dieterich J.-H. Mitochondriale genom- und expressionsanalysen zur charakterisierung der CMS-systeme tournefortii, juncea und toku-

masu des raps (*Brassica napus* L.). Dissertation Universität Hannover, 2002.

Fu T.D. Production and research on rapeseed in the Peoples Republic in China. Cruciferae Newslett. 1981;6:6-7.

Giancola S., Rao Y., Chaillou S., Hiard S., Martin-Canadell A., Pelletier G., Budar F. Cytoplasmic suppression of Ogura cytoplasmic male sterility in European natural populations of *Raphanus raphanistrum.* Theor. Appl. Genet. 2007;114(8):1333-1343.

Hu B. Sterility and variation resulting from the transfer of polima cytoplasmic male sterility from *Brassica napus* into Brassica chinensis. J. Agricult. Sei. 1997;128:299-301.

Heyn F.W. Transfer of restorer genes from Raphanus to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. Cruciferae Newslett. 1976;1:15-16.

L'Homme Y., Stahl R.J., Li X.-Q., Hameed A., Brown G.G. Brassica nap cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the polCMS associated orf224 gene. Curr. Genet. 1997;31:325-335.

Landgren M., Zetterstrand M., Sundberg E., Glimelius K. Alloplasmic male-sterile Brassica lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. Plant Mol. Biol. 1996;32:879-890.

Liu Z., Liu P., Long F., Hong D., He Q., Yang G. Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene Rfp for pol CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. 2012;125: 773-779.

Li D. Preliminary report on breeding of male sterile, maintainer and restorer lines in *Brassica napus* L. Shaanxi J. Agricultural Sci. 1980; 1:26-29.

Motegi T., Nou I.S., Zhou J., Kanno A., Kameya T., Hirata Y. Obtaining an Ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile). Euphytica. 2003;129:319-323.

Niemela T., Jauhiainen S.L., Tulisalo U. Transfer of the Kosena Rfk1 gene, required in hybrid seed production, from oilseed rape to turnip rape. Euphytica. 2010;175:1-12.

Ogura H. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 1968;6:39-78.

Pradhan A., Mukhopadhyay A., Pental D. Identification of the putative cytoplasmic donor of a CMS system in *Brassica juncea*. Plant Breeding. 1991;106:204-208.

Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rouselle P., Renard M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. 1983;191:244-250.

Rawat D.S., Anand I.J. Male sterility in Indian mustard. Indian J. Genet. Plant Breeding. 1979;39:412-414.

Sakai T., Imamura J. Somatic Hybridization Between Radish (*Raphanus sativus*) and Rapeseed (*Brassica napus*). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Hybridization in Crop Improvement I. Ed. Y.P.S. Dajaj. Berlin Heidelberg, 1994;27:320-333.

Shiga T. Male sterility and cytoplasmic differentiation. Brassica Crops and Wild Allies-Biology and Breeding. Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press, 1980.

Shiga T., Baba S. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape, *B. napus* L. and its utilization to breeding. Jap. J. Breed. 1973;23:187-197.

Tanaka Y., Tsuda M., Yasumoto K., Yamagishi H., Terachi T. A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). BMC Genomics. 2012;13:352-352. DOI: 10.1186/1471-2164-13-352

Thompson K.F. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape. Heredity. 1972;29:253-257.

Wang C., Chen X., Lan T., Li H., Song W. Cloning and transcript analyses of the chimeric gene associated with cytoplasmic male sterility in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*). Euphytica. 2006;151:111-119.

Wang Y., Ma S., Wang M., Zheng X., Gu M., Hu S. sequence analysis of the gene correlated with cytoplasmic male sterility (CMS) in rapeseed (*Brassica napus*) Polima and Shaan 2A. Chin. Sci. Bull. 2002;47(2):124-128.

Wei W.L., Wang H.Z., Liu G.H. Molecular identification of the sterile cytoplasm of NCa of a cytoplasmic male sterile line in rapeseed (*Brassica napus* L.). Sci. Agric. Sin. 2005;38:1965-1972.

Yamagishi H., Bhat S.R. Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. Breeding Sci. 2014;64:38-47. DOI: 10.1270/jsbbs.64.38

Yamagishi H., Glimelius K. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*). Plant Cell Rep. 2003;22:52-58.

Yamagishi H., Terachi T. Intra-and inter-specific variations in the mitochondrial gene orf138 of Ogura-type male sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum.* Theor. Appl. Genet. 2001;103:725-732.

Yang G.S., Fu T.D., Yang X.N. Studies on the ecotypical male sterile line of *Brassica napus* L. Acta Agronomica Sinica. 1995;21(2): 129-135.

Yarrow S.A., Burnett L.A., Wildeman R.P., Kemble R.J. The transfer of «Polima» cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion. Plant Cell Rep. 1990;9:185-188.

Zhao H.X., Li Z.J., Hu S.W., Sun G.L., Chang J.J., Zhang Z.H. Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by multiplex PCR assay. Theor. Appl. Genet. 2010;121:643-650.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):538-544
DOI 10.18699/VJ15.070

Влияние типов цитоплазматической мужской стерильности на содержание хлорофилла в листьях гибридов зернового сорго

О.П. Кибальник[1], Л.А. Эльконин[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы «Россорго», Саратов, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», Саратов, Россия

Эффективное использование новых типов цитоплазматической мужской стерильности в селекции гетерозисных гибридов сорго невозможно без знания их влияния на основные биологические и хозяйственно ценные признаки растений. Воздействие стерильных цитоплазм типов A3, A4, 9E и M35-1A на содержание хлорофиллов ***a*** и ***b*** в разные фазы развития растений сорго исследовали у гибридов F_1, полученных в результате скрещивания двух наборов изоядерных ЦМС-линий (с геномами Пищевого 614 и Желтозерного 10) с двумя опылителями (Пищевое 35 и Меркурий). Обнаружено, что разные типы ЦМС-индуцирующих цитоплазм различаются между собой по содержанию хлорофиллов, при этом генотипы ЦМС-линии и опылителя влияют на проявление цитоплазматических различий. У гибридов, полученных с использованием ЦМС-линий с геномом Пищевого 614, обнаружено, что стерильная цитоплазма M35-1A повышала содержание хлорофилла ***a***, по сравнению с цитоплазмой 9E. У гибридов, полученных с использованием ЦМС-линий с геномом Желтозерного 10 и опылителя Пищевого 35, стерильная цитоплазма A4 повышала сумму хлорофиллов ***a*** и ***b***, по сравнению с цитоплазмами A3 и 9E, тогда как у гибридов, полученных при использовании опылителя Меркурий, различия между цитоплазмами не наблюдались. Выявлен эффект гетерозиса по содержанию хлорофиллов ***a*** и ***b*** в фазу кущения у гибридов F_1 на основе ЦМС-линий с геномом Пищевого 614 на стерильных цитоплазмах типов M35-1A и 9E. У гибридов на основе цитоплазмы M35-1A наблюдалось сверхдоминирование общего содержания хлорофиллов: истинный гетерозис превышал аналогичные показатели у гибридов на цитоплазме 9E на 19,0 %, гипотетический – на 20,6 %. Данные показывают, что привлечение новых типов ЦМС-индуцирующих цитоплазм позволяет создавать гибриды с эффектом гетерозиса по содержанию хлорофилла и может быть использовано для повышения их продуктивности.

Ключевые слова: сорго; гибриды F_1; цитоплазматическая мужская стерильность; изоядерные линии; хлорофилл; гетерозис.

Effect of cytoplasmic male sterility type on chlorophyll content in leaves of grain sorghum hybrids

O.P. Kibalnik[1], L.A. Elkonin[2]

[1] All-Russia Research Institute for Sorghum and Maize "Rossorgo", Saratov, Russia
[2] Agricultural Research Institute for the South-East Region of Russia, Saratov, Russia

New types of CMS-inducing cytoplasms cannot be applied to hybrid sorghum breeding without knowledge of their effects on major biological and commercial plant traits. In our studies of F_1 hybrids obtained by crossing of two sets of isonuclear CMS lines (with nuclear genomes of cv. Pishchevoye 614 (P614) and Zhelyozyornoye 10 (Zh10)) to two pollen parents (cv. Pishchevoye 35 (P35) and Mercury), we focused our attention on the effects of A3, A4, 9E, and M35-1A cytoplasms on chlorophyll content at different developmental stages of sorghum plants. It was found that hybrids with different types of male-sterile cytoplasm differed in chlorophyll content, and the genotypes of the CMS line and the pollen parent influenced the manifestation of cytoplasmic differences. In the F_1 hybrids obtained with CMS lines possessing the P614 genome, sterile M35-1A cytoplasm increased chlorophyll ***a*** content, in comparison to 9E cytoplasm. In the F_1 hybrids obtained with CMS lines with the Zh10 genome and the P35 pollen parent, sterile A4 cytoplasm increased the sum of chlorophyll ***a*** and ***b***, in comparison to A3 and 9E cytoplasms, whereas no differences were recorded in the F_1 hybrids obtained with Mercury. The F_1 hybrids obtained with CMS lines with the P614 genome showed heterosis for total chlorophyll content at the tillering stage. Overdominance of this trait was observed in hybrids with M35-1A cytoplasm; true heterosis exceeded analogous indices in 9E cytoplasm by 19.0 %, and the hypothetical heterosis, by 20.6 %. These data demonstrate that the application of new types of CMS-inducing cytoplasms allows raise of F_1 hybrids with heterosis for chlorophyll content. Thus, such types can be used to increase hybrid productivity.

Key words: grain sorghum, F_1 hybrids, cytoplasmic male sterility, isonuclear lines, chlorophyll, heterosis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?
Кибальник О.П., Эльконин Л.А. Влияние типов цитоплазматической мужской стерильности на содержание хлорофилла в листьях гибридов зернового сорго. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):538-544. DOI 10.18699/VJ15.070

HOW TO CITE THIS ARTICLE?
Kibalnik O.P., Elkonin L.A. Effect of cytoplasmic male sterility type on chlorophyll content in leaves of grain sorghum hybrids. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5): 538-544. DOI 10.18699/VJ15.070

УДК 633.174+631.522:58.083.5
Поступила в редакцию 02.03.2015 г.
Принята к публикации 08.04.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: kibalnik79@yandex.ru; lelkonin@gmail.com

Формирование фотосинтетического аппарата – сложный процесс, который контролируется тесно взаимодействующими между собой ядерными и цитоплазматическими генетическими системами растительной клетки (Lopez-Juez, Pyke, 2005; Pogson, Albrecht, 2011). Скоординированная экспрессия генов ядра и цитоплазмы достигается путем их внутриклеточных взаимодействий с помощью разнонаправленных механизмов регуляции – антероградной (от ядра к хлоропластам и митохондриям) и ретроградной (от пластид и митохондрий к ядру), обеспечивающей обратную связь между клеточными органеллами и ядром (Fujii et al., 2007; Chi et al., 2013; Blanco et al., 2014). Очевидно, что посредством ретроградных сигналов хлоропласты и митохондрии могут регулировать экспрессию ядерных генов, которые кодируют компоненты фотосистем I и II, а также различных ферментных систем, локализованных в этих органеллах. Важная роль ретроградных пластидных сигналов отмечена и для биосинтеза хлорофилла (Юрина, Одинцова, 2007), накопление которого контролируется ядерным геномом (Eckhardt et al., 2004; Bollivar, 2006; Masuda, Fujita, 2008). Такая скоординированная работа митохондриального, ядерного и хлоропластного геномов позволяет предположить, что генетически различные типы цитоплазм могут влиять на содержание хлорофилла в фотосинтезирующих тканях растения и тем самым определять интенсивность фотосинтеза и урожайность сельскохозяйственных культур (Адрианова, Тарчевский, 2000). Возможность такого влияния необходимо учитывать и использовать в селекции на гетерозис, в частности, при создании линий с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), поскольку как митохондриальные, так и хлоропластные геномы различаются у разных стерильных цитоплазм (Frankel et al., 1979; Delorme et al., 1997; Tang et al., 2005; Tanaka et al., 2012; Heng et al., 2014).

В результате гибридизации образцов, относящихся к разным видам и расам рода *Sorghum*, было выявлено большое число разных типов ЦМС-индуцирующих цитоплазм. Эти типы цитоплазм отличаются от цитоплазмы A1 (*milo*), традиционно используемой в селекции сорго, по реакции на тестеры-восстановители фертильности, морфологии и гистологической структуре пыльников, стадии дегенерации пыльцы, структуре митохондриального и хлоропластного геномов (Pring et al., 1995; Reddy et al., 2005). Было показано, что у гибридов F_1 новые типы цитоплазм влияют на проявление некоторых селекционно ценных признаков (Moran et al., 2003; Aruna et al., 2013), однако этот вопрос изучен недостаточно широко.

Ранее нами было показано, что стерильные цитоплазмы типов A2, A4 и 9E обусловливают значительно более высокое содержание хлорофилла у гибридов F_1 сорго, в сравнении с цитоплазмой A1 (Кибальник, Эльконин, 2009). В данной статье сообщается о различных эффектах новых типов стерильных цитоплазм на содержание хлорофилла у гибридов F_1, при этом впервые приводятся данные, свидетельствующие о влиянии цитоплазмы M35-1A на проявление у сорго гетерозиса по общему содержанию хлорофиллов ***a*** и ***b***.

Материалы и методы

В работе исследовали гибриды F1, полученные на основе двух наборов аллоплазматических ЦМС-линий зернового сорго (Sorghum bicolor (L.) Moench): 1) с ядерным геномом линии Желтозерное 10 на цитоплазмах A3, A4 и 9E; и 2) с ядерным геномом линии Пищевое 614 на цитоплазмах M35-1A и 9E. Эти изоядерные линии, имеющие одинаковый ядерный геном, но различающиеся друг от друга типом цитоплазмы, были созданы ранее путем серий беккроссов Желтозерного 10 и Пищевого 614 с ЦМС-линиями A3 T × 398, A4 T × 398, 9E T × 398, M35-1A, любезно предоставленными доктором К. Шертцем (Texas Agricultural Experimental Station, США), несущими цитоплазмы следующих источников стерильности: A3 (IS1112C), A4 (IS7920C), 9E (IS17218), M35-1A (Maldandi) (Эльконин и др., 1997; Elkonin et al., 1995, 1997). В данном исследовании использовали растения из семей BC9 (ЦМС-линии с геномом Пищевого 614) и BC15 (ЦМС-линии с геномом Желтозерного 10). Опылителями являлись сорта зернового сорго Меркурий и Пищевое 35. Все использованные в опытах опылители и рекуррентные родительские линии поддерживались до начала исследований в условиях строгой изоляции, при которой растения в каждый вегетационный период до начала цветения изолировали пергаментными изоляторами. Родительские формы и гибриды F1 выращивали на опытном поле ФГБНУ РосНИИСК «Россорго» в трехкратной повторности в 2010 г. Площадь делянки – 7,7 м2. Размещение делянок рендомизированное.

Содержание хлорофиллов ***a*** и ***b*** определяли спектрофотометрическим методом (Ермаков, 1987) у четвертого снизу листа у трех растений с рядка в фазы кущения и выметывания в трехкратной повторности (с трех рядков, размещенных рендомизированно; всего у каждой линии или гибрида было изучено по 9 растений в каждой фазе онтогенеза). Навеску массой 5 г из свежих листьев растирали в ступке с небольшим количеством ацетона (ОКП263321005404 ТУ6-09-3513-86 ОП-2 ОСЧ 9-5) и песка в присутствии углекислого кальция (ОКП 262112083209 ЧДА ГОСТ 4166-76). Извлечение пигментов проводили небольшими порциями ацетона до обесцвечивания фильтрата. Измеряли объем профильтрованного экстракта. Затем 1 мл профильтрованного экстракта разбавляли ацетоном до 25 мл и у полученного раствора измеряли оптическую плотность на спектрофотометре ПЭ-5300В. Концентрацию (C) пигментов рассчитывали по уравнениям Хольма – Веттштейна (1–2):

$$C_{\text{хл. } \boldsymbol{a}} = 9{,}784 \cdot D_{662} - 0{,}990 \cdot D_{664}, \quad (1)$$

$$C_{\text{хл. } \boldsymbol{b}} = 21{,}426 \cdot D_{664} - 4{,}650 \cdot D_{662}, \quad (2)$$

где D_{662} и D_{664} – показания оптической плотности на приборе хлорофилла ***a*** и ***b***.

Содержание пигментов в исследуемом материале с учетом объема вытяжки и навески определяли по формуле (3):

$$A = C \cdot V/(P \cdot 1000), \quad (3)$$

где *A* – содержание пигмента, мг/г сухого (или сырого) веса; *C* – концентрация пигмента, мг/л; *V* – объем вытяжки, мл; *P* – навеска сухого (или сырого) веса.

Коэффициент фенотипического доминирования (*H*р), гипотетический ($Г_{гип.}$) и истинный гетерозис ($Г_{ист.}$) определяли по формулам (4–6) (Гужов и др., 1999):

$$Hр = (F_1 - Pср) / (Pл - Pср), \quad (4)$$

$$Г_{ист.} = ((F_1 - Pл) / Pл) \cdot 100\ \%, \quad (5)$$

$$Г_{гип.} = ((F_1 - Pср) / Pср) \cdot 100\ \%, \quad (6)$$

где F_1 – значение изучаемого признака у гибридов F_1; *P*ср – среднее значение у обеих родительских форм; *P*л – значение у лучшей родительской формы.

Статистическая обработка результатов исследований выполнена с помощью пакета программ «AGROS 2.09» методом двухфакторного (для родительских форм) и трехфакторного (для гибридов) анализов с использованием критерия множественных сравнений Дункана (Доспехов, 2011).

Результаты и обсуждение

Анализ содержания хлорофиллов ***a*** и ***b*** выявил значимые различия между гибридами F_1, полученными на основе разных наборов ЦМС-линий. Гибриды, созданные с использованием ЦМС-линий с геномом Пищевого 614, существенно отличались от гибридов, полученных на основе ЦМС-линий с геномом Желтозерного 10, большим количеством хлорофиллов (табл. 1). Высокое содержание хлорофиллов ***a*** (1,35 мг/г) и ***b*** (0,41 мг/г), их сумма (1,77 мг/г) и отношение хлорофиллов ***a*** к ***b*** (4,00) отмечены у гибридов с цитоплазмой M35-1A, наименьшие показатели концентрации хлорофиллов – у гибридов на цитоплазме A3.

Гибриды на основе ЦМС-линий с геномом Пищевого 614

Между гибридами, полученными на основе изоядерных аллоплазматических ЦМС-линий с геномом Пищевого 614, были выявлены значимые различия по количеству хлорофилла ***a*** и сумме хлорофиллов. У гибридов с ЦМС-индуцирующей цитоплазмой M35-1A показатели хлорофилла ***a*** и суммы пигментов существенно выше, чем у гибридов с цитоплазмой 9E (1,34 и 1,76 мг/г против 1,14 и 1,52 мг/г соответственно). По количеству хлорофилла ***b*** и отношению хлорофиллов ***a*** к ***b*** гибриды значимо не различались между собой, хотя у гибридов с цитоплазмой 9E показатели этих признаков были ниже.

Гибриды на основе ЦМС-линий с геномом Желтозерного 10

Гибриды, полученные с использованием ЦМС-линий с геномом Желтозерного 10 на цитоплазмах A3, A4 и 9E, достоверно не различались по содержанию пигментов и их соотношению. Значения признака «отношение хлорофиллов ***a*** к ***b***» варьировали от 2,9 до 4,0. Однако детальный анализ показал, что гибриды с опылителями Меркурием и Пищевым 35 по-разному реагировали на генетически различные типы стерильных цитоплазм. У гибридов с Пищевым 35 на цитоплазме A4 показатель «суммы хлорофиллов» был значимо выше, чем на цитоплазмах A3 и 9E (0,97 мг/г против 0,72–0,76 мг/г соответственно). Однако у гибридов с Меркурием различия между цитоплазмами по содержанию хлорофиллов отсутствовали, количество составляло 1,08–1,14 мг/г. Очевидно, что наличие или отсутствие влияния типа цитоплазмы на содержание пигментов у гибридов с одними и теми же материнскими линиями, но разными опылителями является следствием специфического взаимодействия ядерных и цитоплазматических генов.

Ранее нами было отмечено влияние типа ЦМС на содержание хлорофиллов у гибридов F_1, полученных на основе этого же набора аллоплазматических линий на цитоплазмах A3, A4 и 9E с сортом Волжское 615 (Кибальник, Эльконин, 2009). Причем эффект типа цитоплазмы наблюдался на стадии кущения: цитоплазма A3 снижала количество зеленых пигментов, а цитоплазма A4 повышала их содержание. Наибольшее количество хлорофиллов в среднем за периоды «всходы – кущение» и «всходы – выметывание» было выявлено у гибрида на цитоплазме 9E (Кибальник, Эльконин, 2009).

Примечательно, что сами материнские изоядерные линии с разными типами стерильных цитоплазм не различаются между собой по содержанию пигментов (табл. 2). Следовательно, эффект цитоплазмы наблюдается только при ее взаимодействии с ядерным геномом опылителя. В этой связи следует заметить, что у аллоплазматических линий ячменя, несущих цитоплазмы разных дикорастущих форм *Hordeum spontaneum* (W3, W4, W8) и геномы культурных сортов, содержание хлорофиллов ***a*** и ***b*** значимо варьировало в разных ядерно-цитоплазматических комбинациях (Шимкевич и др., 2006).

Наибольшее количество хлорофиллов у родительских форм и гибридов наблюдалось в фазу кущения, а показатель «отношение хлорофиллов» – в фазу выметывания. У родительских форм существенные различия по содержанию хлорофилла ***a*** между фазами отсутствовали, тогда как у гибридов в фазу кущения концентрация хлорофилла ***a*** была выше. Сумма хлорофиллов в листьях исходных форм составила 1,19–1,80 мг/г, а отношение хлорофилла ***a*** к ***b*** – 2,05–3,17. Более высокие показатели хлорофиллов выявлены у сортов-опылителей: у Меркурия – хлорофилла ***a*** (1,30 мг/г), у Пищевого 35 – хлорофилла ***b*** (0,56 мг/г).

На основании полученных данных у гибридов F_1 с разными типами стерильных цитоплазм была изучена степень проявления гетерозиса по общему содержанию хлорофилла в листьях растений в фазу кущения (табл. 3). Выявлено, что у гибридов на основе ЦМС-линий с геномом Желтозерное 10 доминирование признака «сумма хлорофиллов» отсутствует. Исключение составила комбинация с сортом Пищевое 35 на цитоплазме типа A4, у которой коэффициент фенотипического доминирования (*H*р) был равен двум (рис. 1, *а*, *б*).

Вместе с тем у гибридов, полученных с использованием ЦМС-линий с геномом Пищевого 614 на стерильных цитоплазмах типов M35-1A и 9E, обнаружен эффект гетерозиса по содержанию хлорофиллов в фазу кущения.

Таблица 1. Содержание хлорофилла (мг/г) в листьях гибридов F_1 с разными типами стерильных цитоплазм

Тип цитоплазмы (фактор A)	Опылитель (фактор B)	Фаза развития растений (фактор C)	Хлорофиллы			
			a	***b***	***∑ab***	***a/b***
Гибриды на основе ЦМС-линий с геномом Желтозерного 10						
A3	Меркурий	Кущение	1,12 lm	0,54 hij	1,66 m	2,04
		Выметывание	0,55 cde	0,07 a	0,62 d	7,86
	Пищевое 35	Кущение	0,87 hij	0,38 b–i	1,25 j	2,23
		Выметывание	0,14 a	0,05 a	0,19 a	2,80
Среднее по гибридам с цитоплазмой A3			0,67 a	0,26 a	0,93 a	3,73
A4	Меркурий	Кущение	0,97 ijk	0,56 ij	1,53 klm	1,73
		Выметывание	0,56 de	0,08 a	0,64 d	7,00
	Пищевое 35	Кущение	1,02 klm	0,52 f–j	1,54 lm	1,96
		Выметывание	0,25 a	0,14 a	0,39 b	1,79
Среднее по гибридам с цитоплазмой A4			0,71 a	0,32 abc	1,03 a	3,43
9E	Меркурий	Кущение	1,12 m	0,53 g–j	1,65 m	2,11
		Выметывание	0,54 bcd	0,07 a	0,61 cd	7,71
	Пищевое 35	Кущение	0,82 gh	0,42 d–i	1,24 ij	1,95
		Выметывание	0,19 a	0,08 a	0,27 ab	2,38
Среднее по гибридам с цитоплазмой 9E			0,68 a	0,28 ab	0,94 a	3,54
Гибриды на основе ЦМС-линий с геномом Пищевого 614						
M35-1A	Меркурий	Кущение	1,76 q	0,43 e–i	2,19 op	4,09
		Выметывание	0,98 jkl	0,19 a–e	1,17 hij	5,16
	Пищевое 35	Кущение	1,76 pq	0,89 k	2,65 q	1,98
		Выметывание	0,86 hij	0,18 abc	1,04 gh	4,78
Среднее по гибридам с цитоплазмой M35			1,34 c	0,42 c	1,76 c	4,00
9E	Меркурий	Кущение	1,46 n	0,41 c–i	1,87 n	3,56
		Выметывание	0,68 ef	0,21 a–e	0,89 efg	3,24
	Пищевое 35	Кущение	1,61 o	0,73 jk	2,34 p	2,21
		Выметывание	0,81 fgh	0,17 abc	0,98 fgh	4,76
Среднее по гибридам с цитоплазмой 9E			1,14 b	0,38 bc	1,52 b	3,44
Среднее по гибридам с опылителями						
	Меркурий		0,98 b	0,31	1,28 b	4,45 b
	Пищевое 35		0,83 a	0,36	1,20 a	2,68 a
Среднее по фазам развития растений						
		Кущение	1,27 b	0,53 b	1,80 b	2,38 a
		Выметывание	0,56 a	0,12 a	0,68 a	4,75 b
F_A			227,5*	3,9*	178,1*	1,1
F_B			41,6*	1,5	10,4*	11,4*
F_C			1 426,6*	183,5*	1 929,5*	19,8*
F_{AB}			18,6*	4,0*	27,7*	0,6
F_{AC}			8,9*	0,2	5,3*	0,4
F_{ABC}			2,8	4,8*	6,0*	2,4

Приведены средние по трем повторностям; данные в столбцах по каждому признаку, обозначенные разными буквами, значимо различаются между собой при $p \leq 0,05$, в соответствии с тестом множественных сравнений Дункана; ***∑ab*** – сумма хлорофиллов ***a*** и ***b***, мг/г; ***a/b*** – отношение содержания хлорофиллов ***a*** к ***b***; * $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Содержание хлорофиллов (мг/г) в листьях родительских форм

ЦМС-линия[1], сорт (фактор А)	Фаза развития растений (фактор В)	Хлорофиллы			
		a	***b***	***∑ab***	***a/b***
А3 Желтозерное 10	Кущение	0,90	0,48	1,38	1,88
	Выметывание	0,81	0,19	1,00	4,26
Среднее		0,85 a	0,34	1,19	3,07
А4 Желтозерное 10	Кущение	0,91	0,47	1,38	1,94
	Выметывание	0,90	0,22	1,12	4,09
Среднее		0,90 a	0,35	1,25	3,01
9Е Желтозерное 10	Кущение	0,90	0,47	1,37	1,91
	Выметывание	0,80	0,18	0,98	4,44
Среднее		0,85 a	0,33	1,18	3,17
М35-1А Пищевое 614	Кущение	0,89	0,49	1,38	1,82
	Выметывание	0,79	0,25	1,04	3,16
Среднее		0,84 a	0,37	1,21	2,49
9Е Пищевое 614	Кущение	0,89	0,48	1,37	1,85
	Выметывание	0,80	0,26	1,06	3,08
Среднее		0,84 a	0,37	1,21	2,46
Меркурий	Кущение	1,45	0,41	1,86	3,54
	Выметывание	1,16	0,56	1,73	2,07
Среднее		1,30 b	0,49	1,80	2,80
Пищевое 35	Кущение	0,66	0,83	1,49	0,79
	Выметывание	0,93	0,28	1,21	3,32
Среднее		0,79 a	0,56	1,35	2,05
Среднее по фазам развития растений					
	Кущение	0,94	0,52 b	1,46 b	1,96 a
	Выметывание	0,88	0,28 a	1,16 a	3,49 b
F_A		9,9*	3,2	4,8	0,3
F_B		1,6	47,9*	15,7*	12,4*

[1] Указан тип цитоплазмы и источник ядерного генома. Остальные пояснения см. в табл. 1.

Таблица 3. Проявление гетерозиса (%) у гибридов F_1 по общему содержанию хлорофиллов в листьях в фазу кущения

Комбинации скрещиваний	*H*p	$Г_{ист.}$	$Г_{гип.}$
А3 Желтозерное 10 / Меркурий	0,16	–10,96 d	3,07 d
А4 Желтозерное 10 / Меркурий	–0,38	–17,47 b	–5,24 b
9Е Желтозерное 10 / Меркурий	0,16	–11,02 d	2,47 cd
А3 Желтозерное 10 / Пищевое 35	–3,80	–18,25 a	–11,89 ab
А4 Желтозерное 10 / Пищевое 35	2,00	3,36 f	6,94 d
9Е Желтозерное 10 / Пищевое 35	–3,17	–16,78 c	–13,29 a
М35-1А Пищевое 614 / Меркурий	2,38	17,74 g	35,18 f
9Е Пищевое 614 / Меркурий	1,04	0,53 e	15,43 e
М35-1А Пищевое 614 / Пищевое 35	24,2	77,85 i	84,03 h
9Е Пищевое 614 / Пищевое 35	15,2	57,05 h	62,50 g
$F_{факт.}$	–	898 965,3*	301,89*

* $p \leq 0,05$. *H*p – коэффициент фенотипического доминирования; $Г_{ист.}$ – истинный гетерозис, %; $Г_{гип.}$ – гипотетический гетерозис, %. Данные в столбцах по каждому признаку, обозначенные разными буквами, значимо различаются между собой при $p \leq 0,05$, в соответствии с тестом множественных сравнений Дункана.

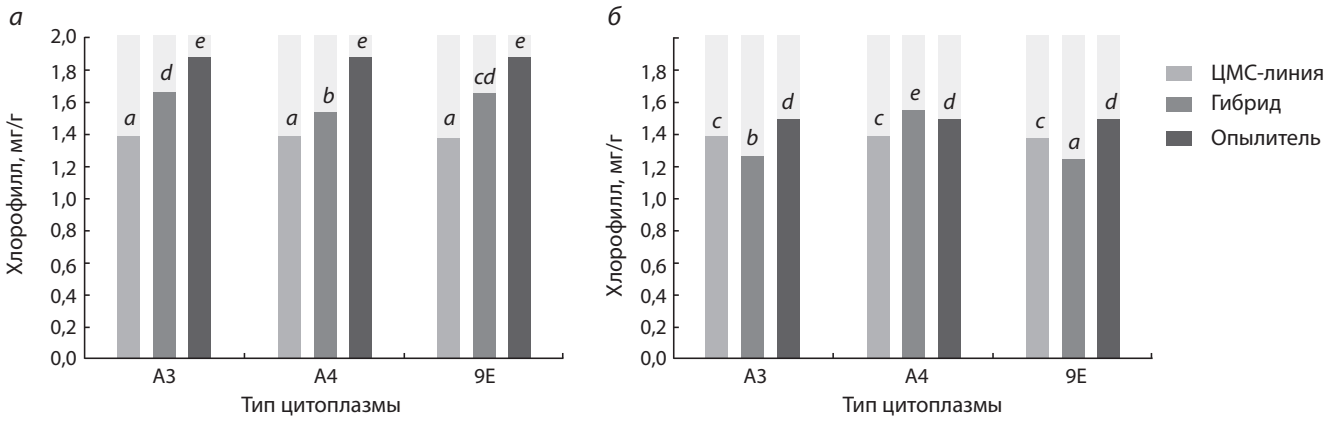


Рис. 1. Сумма хлорофиллов (мг/г) у ЦМС-линий с геномом Желтозерного 10 и типами цитоплазм A3, A4 и 9E и гибридов F_1 на их основе с сортами Меркурий (*а*) и Пищевое 35 (*б*) в фазу кущения.

Данные, обозначенные разными буквами, значимо различаются между собой, в соответствии с тестом множественных сравнений Дункана при $p \leq 0,05$.

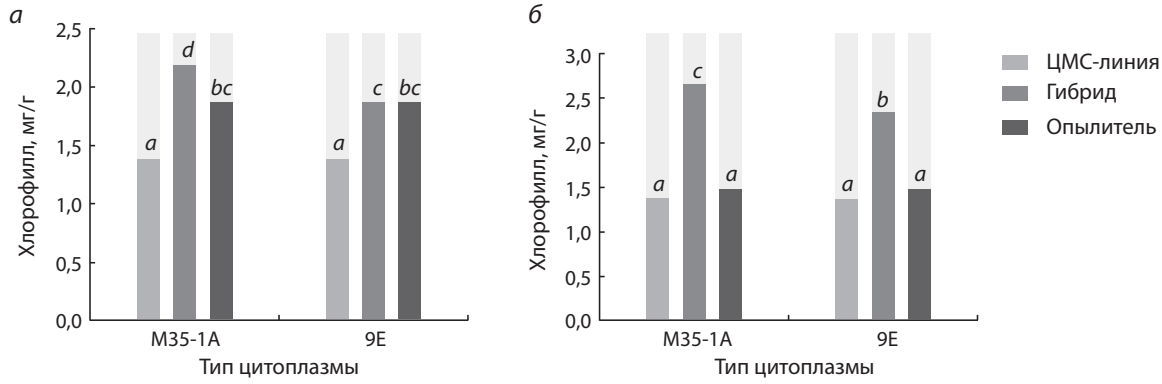


Рис. 2. Сумма хлорофиллов (мг/г) у ЦМС-линий с геномом Пищевого 614 и типами цитоплазм M35-1A и 9E и гибридов F_1 на их основе с сортами Меркурий (*а*) и Пищевое 35 (*б*) в фазу кущения.

Данные, обозначенные разными буквами, значимо различаются между собой, в соответствии с тестом множественных сравнений Дункана при $p \leq 0,05$.

Во всех комбинациях коэффициент фенотипического доминирования превышал единицу. Наиболее значительное проявление эффекта гетерозиса наблюдалось у гибридов, несущих цитоплазму M35-1A (рис. 2, *а*, *б*), при этом в гибридных комбинациях с сортами Меркурий и Пищевое 35 наблюдалось сверхдоминирование (коэффициент фенотипического доминирования составлял 2,38 и 24,2 соответственно). Следует отметить, что у гибридов на цитоплазме M35-1A истинный гетерозис превышал аналогичные показатели у гибридов на цитоплазме 9E на 19,0 %, а гипотетический – на 20,6 %. По-видимому, стерильная цитоплазма M35-1A генерирует некоторые факторы, которые влияют на функционирование ядерных генов, связанных с проявлением гетерозиса по содержанию хлорофилла у гибридов сорго. В последние годы влияние типа ЦМС на проявление гетерозиса по данному признаку было также описано у африканского проса (Satyavathi et al., 2009; Amiribehzadi et al., 2012) и горчицы сарептской (Chamola et al., 2013).

Таким образом, полученные данные показывают, что генетически различные типы ЦМС-индуцирующих цитоплазм различаются между собой по количеству хлорофиллов в листьях растений гибридов F_1. Гибриды на стерильных цитоплазмах типов M35-1A и A4 имеют более высокие показатели хлорофилла ***a*** и суммы хлорофиллов в сравнении с цитоплазмами A3 и 9E. Эти данные указывают на роль цитоплазматических генов в генетическом контроле содержания хлорофилла. Вместе с тем генотип опылителя также влияет на концентрацию пластидных пигментов, при этом различия между разными гибридными комбинациями с одной и той же ЦМС-линией могут быть значительными, что указывает на наличие специфического взаимодействия ядерных и цитоплазматических генов. Кроме того, нами впервые установлено влияние стерильной цитоплазмы на проявление у сорго гетерозиса по общему содержанию хлорофиллов ***a*** и ***b***. Выделены перспективные комбинации скрещиваний с истинным и гипотетическим гетерозисом по сумме хлорофиллов: M35-1A Пищевое 614/Пищевое 35, M35-1A Пищевое 614/Меркурий, 9E Пищевое 614/Пищевое 35, A4 Желтозерное 10/Пищевое 35. Данные показывают, что привлечение новых типов ЦМС позволяет получать гибриды

с эффектом гетерозиса по содержанию хлорофилла и, как следствие, может быть использовано для повышения их продуктивности.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 13-04-01404.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Адрианова Ю.Е., Тарчевский И.А. Хлорофилл и продуктивность растений. М., 2000.

Гужов Ю.Л., Фукс А., Валичек П. Селекция и семеноводство культивируемых растений. М., 1999.

Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М., 2011.

Ермаков А.И. Методы биохимических исследований растений. Л., 1987.

Кибальник О.П., Эльконин Л.А. Влияние типов стерильных цитоплазм на содержание пигментов в листьях гибридов F_1 зернового сорго. Докл. РАСХН. 2009;1:18-21.

Шимкевич А.М., Макаров В.Н., Голоенко И.М., Давыденко О.Г. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата у аллоплазматических линий ячменя. Экол. генетика. 2006;4(2):37-42.

Эльконин Л.А., Кожемякин В.В., Ишин А.Г. Использование новых ЦМС-индуцирующих цитоплазм для создания скороспелых линий сорго с мужской стерильностью. Докл. РАСХН. 1997;2:7-9.

Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов. Физиол. растений. 2007;54(4):485-498.

Amiri Behzadi A., Satyavathi C., Singh S., Bharadwaj C., Singh M. Estimation of heterosis in diverse cytoplasmic male sterile sources of Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. Ann. Agric. Res. 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 though diverse male sterile cytoplasms. Crop Pasture Sci. 2013;63(12):1114-1123. DOI: 10.1071/cp12215

Blanco N.E., Guinea-Díaz M., Whelan J., Strand A. Interaction between plastid and mitochondrial retrograde signalling pathways during changes to plastid redox status. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2014;369:1640. DOI: 10.1098/rstb.2013.0231

Bollivar D.W. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. Photosynth. Res. 2006;89(3):1-22. DOI: 10.1007/s11120-006-9076-6

Chamola R., Balyan H., Bhat S. Effect of alien cytoplasm and fertility restorer genes on agronomic and physiological traits of *Brassica juncea* L. Czern. Plant Breeding. 2013;132(6):681-687. DOI: 10.1111/pbr.12080

Chi W., Sun X., Zhang L. Intracellular signaling from plastid to nucleus. Annu. Rev. Plant Biology. 2013;64:559-582. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120147

Delorme V., Keen C.L., Rai K.N., Leaver C.J. Cytoplasmic-nuclear male sterility in pearl millet: comparative RFLP and transcript analyses of isonuclear male-sterile lines. Theor. Appl. Genet. 1997;95(5):961-968. DOI: 10.1007/s001220050648

Eckhardt U., Grimm B., Hörtensteiner S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. Plant Mol. Biol. 2004;56(1):1-14. DOI: 10.1007/s11103-004-2331-3

Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Nuclear-cytoplasmic interactions in fertility restoration in sorghum: alternative CMS-inducing cytoplasms. Int. Sorghum Millet Newslett. 1995;36:75-76.

Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Comparative analysis of restoration of male-sterile (CMS)-inducing cytoplasms A3 and M35-1. Int. Sorghum Millet Newslett. 1997;38:29-30.

Frankel R., Scowcroft W.R., Whitfeld P.R. Chloroplast DNA variation in isonuclear male-sterile lines of Nicotiana. Mol. Gen. Genet. 1979;169:129-135.

Fujii S., Komatsu S., Toriyama K. Retrograde regulation of nuclear gene expression in CW-CMS of rice. Plant Mol. Biol. 2007;63:405-417. DOI: 10.1007/s11103-006-9097-8

Heng S., Wei C., Jing B., Wan Z., Wen J., Yi B., Ma C., Tu J., Fu T., Shen J. Comparative analysis of mitochondrial genomes between the *hau* cytoplasmic male sterility (CMS) line and its iso-nuclear maintainer line in *Brassica juncea* to reveal the origin of the CMS-associated gene *orf288*. BMC Genomics. 2014;15:322-334. DOI: 10.1186/1471-2164-15-322

Lopez-Juez E., Pyke K.A. Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. Int. J. Dev. Biol. 2005;49(5/6):557-577. DOI: 10.1387/ijdb.051997el

Masuda T., Fujita Y. Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. Photochem. Photobiol. Sci. 2008;7(10):131-1149. DOI: 10.1039/b807210h

Moran J.L., Rooney W.L. Effect of cytoplasm on the agronomic performance of grain Sorghum hybrids. Crop Sci. 2003;43:777-781. DOI: 10.2135/cropsci2003.0777

Pogson B.J., Albrecht V. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. Plant Physiol. 2011;155:1545-1551. DOI: 10.1104/pp.110.170365

Pring D.R., Tang H.V., Schertz K.F. Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. Eds C.S. Levings, I.K. Vasil. The Molecular Biology of Plant Mitochondria. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995.

Reddy B.V.S., Ramesh S., Ortiz R. Genetic and cytoplasmic-nuclear male sterility in Sorghum. Plant Breeding Reviews. Ed. J. Janik. Hoboken, New Jersy: Willey & Sons, Inc. 2005;25:139-169. DOI: 10.1002/9780470650301.ch6

Satyavathi C., Begum S., Singh B., Unnikrishnan K., Bharadwaj C. Analysis of diversity among cytoplasmic male sterile sources and their utilization in developing F_1 hybrids in Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (R.) Br]. Indian J. Genet. Plant Breed. 2009;69(4):352-360.

Tanaka Y., Tsuda M., Yasumoto K., Yamagishi H., Terachi T. A complete of Ogura-type male-starile cytoplasm andits comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). BMC Genomics. 2012;13:352-363. DOI: 10.1186/1471-2164-13-352

Tang S., Sun Y., Zang H., Gu Y., Lu J., Tian S., Yu B., Gu M. Comparison on the characteristics of the isonuclear alloplasmic CMS lines in japonica Rice. Chines J. Rice Sci. 2005;19(6):521-526.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):545-551
DOI 10.18699/VJ15.071

Трансгенные растения как модель для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов

Т.В. Маренкова[1], Е.В. Дейнеко[1, 2]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

Феномен потери экспрессии перенесенных генов в трансгенных растениях был обнаружен в начале 1990-х годов. Изучение данного явления показало зависимость частоты инактивации трансгенов от числа интегрированных копий в растительный геном, особенностей организации встройки (наличие дупликаций, векторных последовательностей и др.), места встраивания. Потеря экспрессии гена может происходить на транскрипционном или посттранскрипционном уровне, в большинстве случаев с участием малых интерферирующих РНК (siРНК). У растений наиболее распространенным эпигенетическим механизмом инактивации генов на уровне транскрипции является РНК-направленное метилирование ДНК. Уникальные для растений РНК-полимераза IV и РНК-полимераза V играют в нем важную роль. РНК-полимераза IV отвечает за синтез некодирующих транскриптов с гена-мишени, которые переводятся в двухцепочечную форму РНК-зависимой РНК-полимеразой и с помощью фермента Dicer разрезаются на siРНК. Они метилируются и транспортируются в эффекторный комплекс, основным компонентом которого является белок семейства Agronaute. РНК-полимераза V также считывает некодирующий транскрипт с гена-мишени, но он служит платформой для привлечения siРНК и последующего присоединения белков и ферментов, ответственных за метилирование ДНК и гистонов. Посттранскрипционная инактивация генов происходит в цитоплазме и связана со специфической деградацией эффекторным комплексом (siРНК и AGO-белок) мРНК, которая имеет участок, комплементарный siРНК. У растений кроме канонического механизма РНК-направленного метилирования ДНК существуют и другие варианты эпигенетической регуляции экспрессии генов, которые включают белки, принимающие участие в инактивации генов на посттранскрипционном уровне, специфические белки и другие типы малых РНК. В данном обзоре кратко рассмотрены известные на данный момент компоненты эпигенетической регуляции и сделан акцент на новые факты.

Ключевые слова: инактивация гена; малые интерферирующие РНК (siRNA); РНК-направленное метилирование ДНК; посттранскрипционная инактивация.

Transgenic plants as a model for studying epigenetic regulation of gene expression

T.V. Marenkova[1], E.V. Deineko[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Tomsk State University, Tomsk, Russia

The phenomenon of loss of expression of transferred genes in transgenic plants was discovered in the early 1990s. The study of this phenomenon revealed dependence of the frequency of gene silencing on the number of integrated copies in the plant genome, the properties of the transgene sequence itself (the presence of duplications, vector sequences, and others), chromosomal position. Loss of gene expression can occur transcriptionally or post-transcriptionally in most cases involving small interfering RNA (siRNA). In plants, the most common mechanism for inactivation of genes at the level of RNA transcription is RNA-directed DNA methylation (RdDM). An important role is played by the plant-specific RNA polymerase IV and V. Pol IV is assumed to transcribe non-coding transcripts at its target loci. They are copied into long dsRNAs and are processed by DICER into siRNAs. siRNAs are then methylated and loaded into the effector complex, whose main component is a protein of the Argonaute family. RNA polymerase V also transcribes the non-coding transcript of the target gene, but it serves as a scaf¬fold that interacts with siRNAs and that recruits proteins and enzymes responsible for DNA and histone methylation. Posttranscriptional gene inactivation occurs in the cytoplasm and is associated with a specific effector complex (AGO-siRNA), which cleavages homologous mRNA. In plants, in addition to the canonical pathway, RdDM, more mechanisms exist, which include components for posttranscriptional gene inactivation, specific proteins and other types of small RNAs. In this review, we briefly discuss the currently known components of epigenetic regulation.

Key words: inactivation of genes expression; siRNA; RNA-dependent DNA methylation; posttranscriptional gene silencing.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?
Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Трансгенные растения как модель для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):545-551. DOI 10.18699/VJ15.071

HOW TO CITE THIS ARTICLE?
Marenkova T.V., Deineko E.V. Transgenic plants as a model for studying epigenetic regulation of gene expression. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):545-551. DOI 10.18699/VJ15.071

УДК 575.117.2:577.216
Поступила в редакцию 01.07.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: marenkova@bionet.nsc.ru

Трансгенные растения являются уникальными инструментами в руках исследователей для решения как прикладных, так и фундаментальных задач. С момента получения первых генетически модифицированных растений был обнаружен феномен потери экспрессии перенесенных генов (gene silencing). Растения, в которых произошла инактивация чужеродной ДНК, отбраковываются экспериментаторами, поскольку они не представляют интереса для практического использования в коммерческих целях, однако оказались удобными моделями для исследования механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Частота инактивации гетерологичных генов в первом поколении от самоопыления исходных трансформантов может составлять от нескольких процентов до половины случаев, по данным разных исследователей (Napoli et al., 1990; Ma, Mitra, 2002; Sallaud et al., 2003). В группу растений с высокой частотой инактивации трансгенов в основном входят трансформанты со множественными инсерциями чужеродной ДНК, встроенными в один или несколько сайтов растительного генома. Однако известны случаи потери экспрессии трансгенов в последующих поколениях при самоопылении моноинсерционных растений (Sallaud et al., 2003; Mourrain et al., 2007) и у гибридов от их скрещиваний (Charrier et al., 2000). Частота инактивации может существенно возрастать, если в состав генетической конструкции включены тандемные копии генов как в прямой, так и обратной ориентации (Heilersig et al., 2006; Lunerová-Bedrichová et al., 2008).

На трансгенных растениях табака, риса и *Arabidopsis thaliana* получены модельные линии, позволяющие изучать данный феномен. A. Matzke с коллегами на трансгенном табаке исследовали свойства и структуру серии аллелей H-трансгена. Аллели со сложной структурой Т-ДНК (с дупликациями, векторными последовательностями) способны вызывать процесс транс-инактивации других чужеродных генов под управлением NOS-промотора в растительном геноме (Matzke et al., 1994; Jakowitsch et al., 1999). Достаточно хорошо исследован мультикопийный трансген 271, способный вызывать замолкание экспрессии трансгенов, находящихся под управлением промотора 35S-РНК вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) у трансгенных растений табака (Vaucheret, 1994; Park et al., 1996; Khaitová et al., 2011). Именно на трансгенных растениях петунии в 1990 г. впервые был описан феномен косупрессии – координированного подавления экспрессии трансгенов и гомологичных им хозяйских генов, связанного с посттранскрипционным разрушением мРНК в цитоплазме (Napoli et al., 1990), которое позже получило название «РНК-интерференция».

Нестабильность экспрессии трансгенов в растениях может быть связана как с полной потерей активности перенесенных генов, так и с мозаичным характером на уровне клеток соматической ткани. Ярким и наглядным примером мозаичной экспрессии трансгенов является перенос дополнительных генов хальконсинтетазы (*chs*) в петунию. В исходных трансформантах с частотой от 5 до 25 % наблюдалась инактивация экспрессии как трансгенных, так и собственных генов *chs*, которая была связана со снижением уровня мРНК и накоплением двух специфических, частично перекрывающихся siРНК размером 21 н., комплементарных кодирующей части гена (De Paoli et al., 2009). Мозаичный характер проявления гена *gfp* под управлением 35S-промотора ВМЦК описан для многокопийных по трансгену растений табака первого и второго поколений от самоопыления. Чередование клеток по листовой пластинке с активным и неактивным геном *gfp* носило случайный характер и отличалось значительной вариабельностью между потомками (Bastar et al., 2004). Описано мозаичное проявление маркерного гена *nptII* в клетках соматической ткани листовой пластинки у трансгенного растения табака Nu 21 (Маренкова и др., 2007). Данный фенотип наследуется в T_1–T_4 и у гибридов F_1 от скрещивания с диким типом. Выделены две линии, контрастно различающиеся по частоте возникновения растений-мозаиков. Установлено, что мозаичность проявления гена *nptII* у трансгенных растений обусловлена действием эпигенетических механизмов и связана с метилированием промотора и кодирующей части гена (Логинова и др., 2012). Интересно, что даже встраивание одной копии гена *uidA* в один и тот же район хромосомы с помощью системы *Cre*/lox рекомбинации может вести к вариабельности в активности гена, что проявляется в стабильном или мозаичном паттерне экспрессии трансгена (Day et al., 2000).

Трансформанты с инактивированным трансгеном используются в экспериментах по индуцированному мутагенезу и выявлению растений-мутантов, у которых произошла реактивация экспрессии чужеродной ДНК. Последующий скрининг позволяет картировать мутации, влияющие на различные этапы механизма репрессии генов. Таким образом были обнаружены многие ключевые белки и ферменты (Herr et al., 2005; Smith et al., 2007; Habu, 2010). Однако данный подход не позволяет выявить все компоненты эпигенетической регуляции из-за наличия мультигенных семейств (утрата функции одного гена может полностью или частично компенсироваться экспрессией других генов семейства) и возможного летального эффекта от потери активности гена. Все работы в данном направлении проводятся на растениях *A. thaliana*, что связано с несомненными преимуществами данного модельного объекта: малый размер генома, небольшое число хромосом, короткий период вегетации, хорошие физическая и молекулярно-генетическая карты, полностью секвенированный геном и большие коллекции инсерционных мутантов. Ведутся исследования и на других видах трансгенных растений (табак, петуния, кукуруза, рис, сосна, тополь и др.), но на данных объектах пока возможно изучение только отдельных аспектов механизмов инактивации экспрессии генов (наследование замолкания экспрессии гена в ряду поколений, влияние на частоту потери экспрессии различных внешних и внутренних факторов и др.). Однако эти исследования также важны, поскольку, несмотря на консервативный характер эпигенетической регуляции, они позволяют выявить возможные видовые особенности.

Инактивация экспрессии трансгена/гена может происходить на транскрипционном (transcriptional gene silencing – TGS) и посттранскрипционном (posttranscriptional gene silencing – PTGS; co-supression) уровнях. Соответственно,

в первом случае наблюдается блокирование синтеза транскриптов мРНК, а во втором – мРНК считывается и обычно регистрируется в ядре, но в дальнейшем происходит ее разрушение в цитоплазме. При этом в большинстве случаев механизм репрессии генов запускается с участием малой интерферирующей РНК (siРНК, small interfering RNA).

РНК-направленное метилирование генов/трансгенов в растительном геноме

Основным эпигенетическим механизмом инактивации генов/трансгенов на уровне транскрипции является РНК-направленное метилирование ДНК (RdDM, RNA-directed DNA methylation). Этот механизм был открыт исследователями при изучении репликации вироида веретеновидности клубней картофеля в трансгенном табаке со вставкой кДНК вироида в ядерном геноме (Wassenegger et al., 1994). После цикла автономной репликации РНК вироида было обнаружено специфическое метилирование кДНК, связанное с образованием двухцепочечной РНК, которая разрезалась ферментом на малые РНК (Mette et al., 2000).

РНК-направленное метилирование ДНК представляет собой специализированную «транскрипционную фабрику», включающую две уникальные для растений РНК-полимеразы (РНК-полимераза IV и РНК-полимераза V) и большое число белков и ферментов (рисунок).

Опишем кратко основные события, последовательность которых ведет к репрессии гена: для образования siРНК необходимо наличие двухцепочечной РНК, которая образуется при считывании РНК-полимеразой IV с последовательности ДНК гена некодирующего транскрипта, который переводится РНК-зависимой РНК-полимеразой в двухцепочечную РНК. Последняя разрезается рибонуклеазой III на siРНК длиной 24 н., которые метилируются в области 3′-конца метилтрансферазой HEN1 (Hue Enhancer 1) и направляются в специализированный рибонуклеопротеиновый комплекс, основным компонентом которого является белок из семейства Argonaute. В составе комплекса siРНК осуществляет поиск комплементарной последовательности с последующим привлечением белков и ферментов, ответственных за подавление активности гена (Маренкова, Дейнеко, 2010; Meyer, 2013; Matzke, Mosher, 2014). Рассмотрим данный механизм инактивации генов на уровне транскрипции подробнее, уделяя внимание новым данным, полученным за последние годы.

У растений кроме трех канонических ДНК-зависимых РНК-полимераз (I, II и III) были обнаружены РНК-полимеразы IV и V, которые произошли от РНК-полимеразы II и играют ключевую роль в механизме RdDM репрессии генов. Предполагают, что РНК-полимераза IV считывает с последовательности ДНК транскрипт, который переводится РНК-зависимой РНК-полимеразой (RNA-dependent RNA polymerase) RDR2 или RDR6 в двухцепочечную РНК. Показано, что РНК-полимераза IV транскрибирует межгенные районы, гены эухроматина, связанные с повторами и транспозонами, при этом она отвечает примерно за 90 % последовательностей, с которых образуется siРНК размером 24 н. (Mosher et al., 2008). Остается пока неизвестным, каким образом РНК-полимераза IV узнает свои сайты. Считают, что в этом ей может помогать белок SHH1 (sawadee homeodomain homolog 1), который, будучи связанным с полимеразой, взаимодействует через уникальный тандемный Tudor-like домен (с двумя «карманами») одновременно с H3K9me и неметилированным H3K4 гистонами (Law et al., 2013). Также, предположительно, облегчает для РНК-полимеразы IV доступ к ДНК белок CLY 1 (classy 1, SWI2/SNF2-фактор), участвующий в моделировании структуры хроматина (Smith et al., 2007).

На следующем этапе дцРНК разрезаются рибонуклеазой III DCL3 (dicer-like 3) на siРНК длиной 24 н. Они метилируются в области 3′-конца метилтрансферазой HEN1 и направляются в специализированные рибонуклеопротеиновые комплексы, основным компонентом которых является белок из семейства Argonaute AGO4 или AGO6. В процессе внедрения siРНК происходит удаление одной из цепей РНК и с AGO-белком связывается антисмысловая одноцепочечная siРНК, комплементарная последовательности гена-мишени. В составе комплекса siРНК по принципу комплементарности осуществляет поиск и направляет эффекторный комплекс к гену-мишени (Yang et al., 2006; Matzke, Mosher, 2014).

На данном этапе важную роль играет РНК-полимераза V, которая считывает некодирующие транскрипты длиной порядка 200 н. Предполагают, что транскрипты удерживаются в хроматине с помощью белка RRP6L1 (RRP6-like protein) (Zhang et al., 2014) и являются платформой для привлечения siРНК и последующего присоединения белков и ферментов, ответственных за метилирование ДНК и гистонов в области сайта-мишени. Для процесса транскрипции РНК-полимеразе V необходимы топоизомераза 1α (TOP1α) (Dinh et al., 2014) и комплекс белков DDR, который включает три белка: DRD1 (defective in RNA-directed DNA methylation 1) – предположительно влияет на структуру хроматина; DMS3 (defective in meristem silencing 3) – белок с гомологией с высоко консервативными белками SMS и RDM1 (RNA-directed DNA methylation 1) – небольшой белок с неизвестной функцией (Gao et al., 2010; Zhong et al., 2012). Данные белки, по-видимому, обеспечивают доступ РНК-полимеразе V к одноцепочечной ДНК.

РНК-полимераза V взаимодействует через CTD-домен на C-конце большой субъединицы NRPE1 с AGO4-белком и с фактором элонгации KTF1 (kow domain-containing transcription factor 1), который также имеет мотив связывания с AGO4-белком. Предполагают, что siРНК в составе AGO4-комплекса по принципу комплементарности связывается с транскриптом, считываемым РНК-полимеразой V, и привлекает метилтрансферазу DRM2 (domains rearranged methyltransferase 2), которая метилирует близлежащую ДНК (Böhmdorfer et al., 2014). Белок RDM1, входящий в состав DDR, возможно, также участвует в привлечении DRM2, поскольку он взаимодействует с AGO4 и DRM2 и связывается с одноцепочечной метилированной ДНК (Gao et al., 2010).

Комплекс белков IDN2–IDP (involved in *de novo* 2-белок и паралоги IDP1 и IDP2) стабилизирует дуплекс siРНК-транскрипт РНК-полимеразы V и участвует в изменении нуклеосомной укладки через взаимодействие с SWI/SNF комплексом (Zhu et al., 2013), а также влияет на связывание DRM2 с транскриптом полимеразы V (Böhmdorfer et al.,

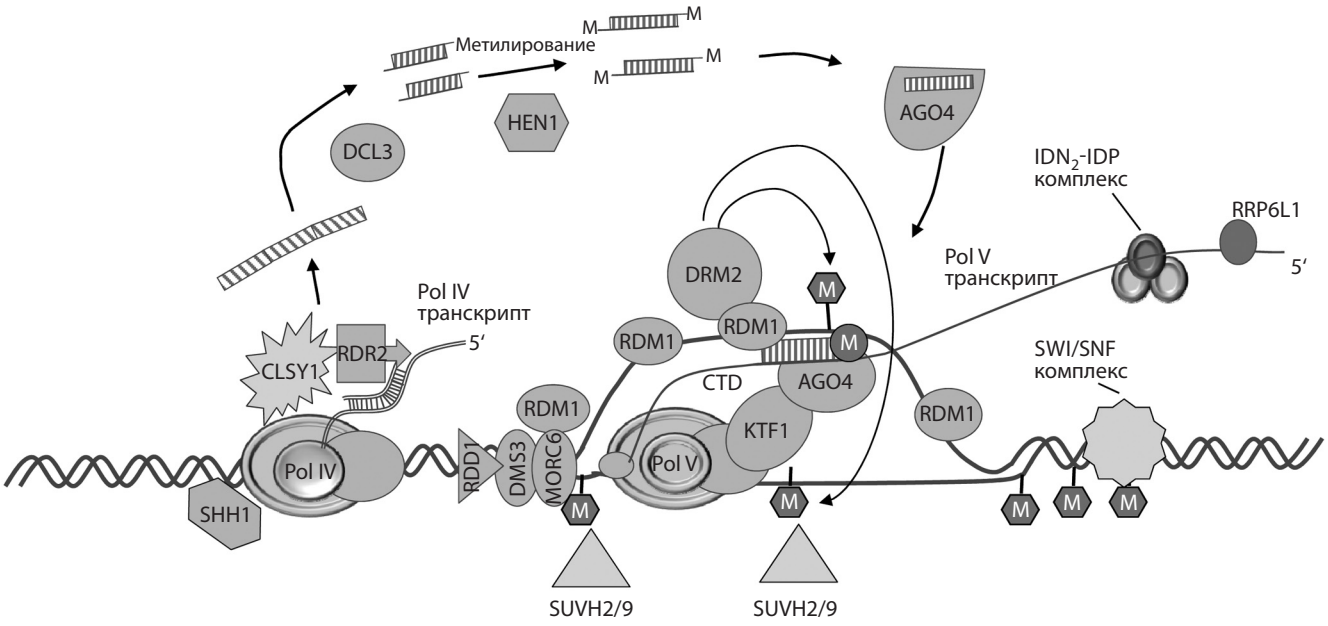


Схема РНК-направленного метилирования ДНК у растений (описание см. в тексте). Из: Matzke, Mosher (2014) с изменениями и дополнениями.

2014). Показано, что связывание IDN2-белка с некодирующим транскриптом зависит от AGO4-белка (Böhmdorfer et al., 2014).

Пока непонятно, как РНК-полимераза V находит свои последовательности. Известно, что бóльшая часть РНК-полимеразы V локализуется в области транспозонов и повторов в области интронов, промотора или кодирующей части гена (Wierzbicki et al., 2012). Возможно, что белки семейства метилтрансферазы гистонов SUVH2, SUVH9, не обладающие каталитической активностью, за счет связывания через SRA-домен с метилированной ДНК и взаимодействия с комплексом белков DDR и MORC (microrchidia-type ATPases, влияют на высший уровень структурной организации хроматина) привлекают полимеразу к сайтам-мишеням (Johnson et al., 2014; Liu et al., 2014).

Метилирование ДНК у растений осуществляется по симметричным (CG, CHG) и несимметричным сайтам (CHH) цитозиновыми метилтрансферазами трех классов. Семейство MET1 (DNA methyltransferase1) отвечает за поддерживающее метилирование CG-сайтов; уникальные для растений хромометилазы CMT3 (chromomethylase3), CMT2 – поддерживающее метилирование CHG-сайтов и семейство DRM (domains rearranged methyltransferase) – метилирование *de novo* (Ванюшин, 2012). Поддержание метилирования в несимметричных сайтах после раунда репликации требует наличия триггерного сигнала, т. е. связано с механизмом РНК-направленного метилирования ДНК. У растений обратный процесс – деметилирование ДНК – может происходить не только пассивно, но и активно (независимо от репликации) при участии семейства ДНК-гликозилаз Demeter (DME), которое включает белки DME (demeter), ROS1 (repressor of silencing 1), DML2 (demeter-like 2) и DML3 (demeter-like 3) (Agius et al., 2006). Предполагают, что наличие механизмов метилирования ДНК, направленного siРНК и активного деметилирования позволяет растениям более динамично регулировать степень модификации генома в ответ на внутренние и внешние сигналы (Matzke, Mosher, 2014). Существование таких антагонистических взаимоотношений косвенно подтверждается тем фактом, что многие известные генетические компоненты РНК-направленного метилирования ДНК были обнаружены как супрессоры мутации *ros1* (*rpa2*, *tsl1*, *rdm2*, *ago6*, *sup32*, *ctf1*) и, наоборот, при мутациях в этих генах (*ago6*, *ago4*, *drm2*, *rdr2*, *drd1*, *met1* и генах, кодирующих субъединицы POL IV и POL V) происходит снижение уровня экспрессии ROS1-белка (Penterman et al., 2007).

До сих пор не известна функция белка MOM1 (Morpheus' molecule1) в эпигенетическом механизме транскрипционной инактивации. Мутация *mom1* выделена по способности восстанавливать экспрессию замолкнувшего мультикопийного трансгена и ряда эндогенных повторяющихся последовательностей. Характерной особенностью мутации является восстановление экспрессии генов при сохранении молекулярных маркеров гетерохроматина – гиперметилированного состояния последовательности ДНК и отсутствия изменений в гистоновых белках (метилирование H3K9 и снижение метилирования H3K4) (Habu, 2010).

Недавно показано, что в процессе РНК-направленного метилирования ДНК у *A. thaliana* участвуют факторы сплайсинга РНК: белок SR45 (arginine/serine-rich 45) активен на ранних этапах образования siРНК; ZOP1 (zinc-finger and OCRE domain-containing protein), возможно, влияет на эффекторный комплекс AGO4 или на DRM2; STA1 (фактор сплайсинга PRP6-like) – на образование как siРНК, так и транскриптов, считываемых РНК-полимеразой V; RDM16 (U4/U6 snRNP-associated protein) регулирует образование транскриптов РНК-полимеразы V (Huang,

Zhu, 2014). Выявлен новый участник РНК-направленного метилирования ДНК – белки FRG1 и FRG2 (SNF2-ring-helicase-like), они относятся к семейству SNF2 helicase-like белков и физически взаимодействуют с SUVR2-белком (Groth et al., 2014).

Отметим, что исследование уровня экспрессии репортерного гена, интегрированного в разные районы хромосомы 1 *A. thaliana* на фоне супрессии основных компонентов РНК-направленного метилирования ДНК (MOM1, CMT3, DRD1, DRM2, SUVH2, histone deacetylase 1 (HD1) и др.), показало существование глобальной эпигенетической сети, которая регулирует экспрессию генов в зависимости от хромосомной локализации гена-мишени и его нуклеотидной последовательности (Luo et al., 2009).

Посттранскрипционная инактивация гена

Посттранскрипционная инактивация генов была обнаружена впервые на трансгенных растениях петунии при попытке изменить окраску цветка введением дополнительных копий генов биосинтеза антоцианов халькон-синтетазы. Однако был получен неожиданный результат – растения с белыми и неравномерно окрашенными пурпурно-белыми цветами. Это указывало на инактивацию экспрессии как трансгенных, так и собственных генов, ответственных за синтез пигментов (Napoli et al., 1990).

Инактивация ДНК на посттранскрипционном уровне происходит в цитоплазме и связана с деградацией мРНК, считываемой с гена. Специфическую деградацию мРНК направляет siРНК размером порядка 21 н., которая образуется из двухцепочечного предшественника. Наработка дцРНК происходит либо из транскриптов, считываемых РНК полимеразой II с инвертированных повторов и образующих стабильную структуру шпильки, либо из одноцепочечных мРНК, которые переводит в духцепочечную форму РНК-зависимая РНК-полимераза RDR6 с участием белка SGS3 (supressor of gene silencing 3, функция Coiled-coil). Фермент DCL4 разрезает образующуюся дцРНК на siРНК размером 21 н., которые метилируются в области 3′-конца метилтрансферазой HEN1. РНП-комплекс при посттранскрипционной инактивации расположен в цитоплазме, основным его компонентом является белок AGO1. В процессе внедрения siРНК происходит удаление одной цепи РНК и с AGO-белком связывается антисмысловая одноцепочечная siРНК, комплементарная транскрибируемой области гена-мишени. Данный комплекс осуществляет ферментативный гидролиз комплементарной мРНК в цитоплазме. Наряду с деградацией мРНК часто происходит также метилирование ДНК гена-мишени в кодирующей части, что в большинстве случаев не мешает процессу транскрипции. Данные эпигенетические изменения направляются siРНК размером 24–26 н., которые образуются при участии DCL2. Роль данного метилирования ДНК в регуляции экспрессии гена на посттранскрипционном уровне пока не известна (Vaucheret, 2006; Дорохов, 2007).

Отдельно выделяется механизм посттранскрипционной инактивации, индуцированный вирусами (VIGS), известны вирусные белки-супрессоры, которые блокируют разные этапы замолкания (Дорохов, 2007; Velásquez et al., 2009; Pooggin, 2013).

Таким образом, эпигенетические механизмы транскрипционной и посттранскрипционной инактивации генов имеют свои уникальные наборы белков и ферментов, а также и общие признаки, такие как участие дцРНК, которая разрезается ферментом Dicer на siРНК; нуклеопротеиновый комплекс, с основным компонентом – белком семейства Argonaute, который с помощью siРНК строго специфично находит комплементарную мишень.

Другие механизмы РНК-направленного метилирования ДНК

Кроме канонического механизма РНК-направленного метилирования ДНК, включающего ферменты РНК-полимеразу IV, RDR2, DCL3, РНК-полимеразу V, AGO4 и siРНК размером 24 н., известны и другие случаи репрессии генов с компонентами инактивации генов на посттранскрипционном уровне, специфическими белками и другими типами малых РНК. Так, на рисе (*Oryza sativa*) показано, что РНК в виде шпильки может разрезаться ферментом DCL3, образуя длинную микроРНК в 24 н. (long miRNA, lmiRNA). МикроРНК транспортируется в AGO4 и может направлять метилирование нуклеотидной последовательности сайта-мишени (Wu et al., 2010).

RDR6-зависимое РНК-метилирование является промежуточным звеном между посттранскрипционной инактивацией транскриптов, считываемых с транспозонов, и их метилированием *de novo*. РНК-полимераза II транскрибирует с транспозонов матричную РНК, которая может достраиваться ферментом RDR6 с образованием двухцепочечной РНК. Затем DCL2 и/или DCL4 разрезают мРНК на siРНК размером 21–22 н. и через комплекс AGO1 запускается разрушение гомологичной мРНК в цитоплазме. Показано, что двухцепочечная РНК может также обуславливать метилирование *de novo*, в котором участвуют белки AGO2, транскрипты полимеразы V и метилтрансфераза DRM2. Инициация метилирования запускает канонический механизм РНК-направленного метилирования, в котором участвуют РНК-полимераза IV, RDR2 и DCL3 с образованием siРНК размером 24 н., что обеспечивает поддержание инактивированного состояния транспозона (Mari-Ordonez et al., 2013; Nuthikattu et al., 2013).

В похожем механизме участвует AGO-связывающий белок NERD (needed for RDR2-independent DNA methylation) с привлечением РНК-полимераз IV и V и компонентов посттранскрипционной инактивации RDR6, SGS3, SDE3 (silencing defective) и SDE5. NERD взаимодействует с гистоном H3 и комплексом AGO2-siРНК 21 н., что обеспечивает метилирование ДНК транспозонов (Pontier et al., 2012).

Показано, что для репрессии низкокопийных генов, не образующих siРНК, важным является считывание некодирующих транскриптов РНК-полимеразой II, которые направляют РНК-полимеразу IV и РНК-полимеразу V к сайтам-мишеням и могут обеспечивать транс-инактивацию в геноме несцепленных гомологичных последовательностей (You et al., 2013).

Отметим, что данные модели инактивации генов описаны для растений *A. thaliana*, табака, петунии. Другие виды растений изучены недостаточно, например для хвойных у *Pinus contorta* класс siРНК 24 н. и гомолог

DCL3 отсутствуют и обнаружено большое разнообразие малых РНК размером 21 н. и новое семейство DCL-белков (Dolgosheina et al., 2008), в то время как у китайской ели (*Cunninghamia lanceolata*) показаны существование РНК-направленного метилирования с участием 24 н. siРНК и наличие DCL3 (Wan et al., 2012). Анализ популяции siРНК у *Brassica rapa* с мутацией в гене большой субъединицы РНК полимеразы IV показал существенно меньшее количество siРНК, зависящих от транскрипции РНК полимеразы IV, по сравнению с *A. thaliana* (Huang et al., 2013).

Таким образом, в процессе эволюции растения выработали множество механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов. Уже не подвергается сомнению важная роль механизмов посттранскрипционной инактивации в качестве иммунной защиты растений от вирусов, вироидов, а транскрипционной инактивации – от неконтролируемого размножения в геноме мобильных генетических элементов. Также предполагается, что механизм РНК-направленного метилирования ДНК позволяет растению быстро и пластично регулировать экспрессию собственных генов в ответ на непредсказуемые условия внешней среды. Обсуждается роль РНК-направленного метилирования ДНК при парамутациях, импринтинге, межклеточном взаимодействии. Выдвинуто предположение, что у цветковых растений данный эпигенетический механизм служит для более быстрой стабилизации и диплоидизации генома при возникновении полиплоидии (Matzke, Mosher, 2014).

Благодарности

Данная работа выполнена в рамках проекта VI.62.1.5 (№ 01201280334) «Разработка и совершенствование генетических конструкций для оптимизации экспрессии целевых генов и синтеза рекомбинантных белков медицинского назначения у трансгенных растений и животных».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у растений: эпигенетический контроль за генетическими функциями. Эпигенетика. Ред. С.М. Закиян, В.В. Власов, Е.В. Дементьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012.

Дорохов Ю.Л. «Умолкание» генов у растений. Молекуляр. биология. 2007;41(4):579-592.

Логинова Д.Б., Меньшанов П.Н., Дейнеко Е.В. Анализ мозаичного проявления *nptII*-гена у контрастных по мозаицизму трансгенных растений табака. Генетика. 2012;48:1280-1286.

Маренкова (Новоселя) Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Мозаичный характер проявления гена *nptII* у трансгенных растений табака Nu 21. Генетика. 2007;43(7):943-954.

Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции. Генетика. 2010;46(5):581-592.

Agius F., Kapoor A., Zhu J.K. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006;103:11796-11801.

Bastar M.T., Luthar Z., Skof S., Bohanec B. Quantitative determination of mosaic GFP gene expression in tobacco. Plant Cell Rep. 2004;22:939-944.

Böhmdorfer G., Rowley M.J., Kuciński J., Zhu Y., Amies I., Wierzbicki A.T. RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA. Plant J. 2014;79(2):181-191. DOI: 10.1111/tpj.12563

Charrier B., Scollan C., Ross S., Zubko E., Meyer P. Co-silencing of homologous transgenes in tobacco. Mol. Breeding. 2000;6:407-419.

Day C.D., Lee E., Kobayashi J., Holappa L.D., Albert H., Ow D.W. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. Gene. Dev. 2000;14:2869-2880.

De Paoli E., Dorantes-Acosta A., Zhai J., Accerbi M., Jeong D.H., Park S., Meyers B.C., Jorgensen R.A., Green P.J. Distinct extremely abundant siRNAs associated with cosuppression in petunia. RNA. 2009;15:1965-1970. DOI: 10.1261/rna.1706109

Dinh T.T., Gao L., Liu X., Li D., Li S., Zhao Y., O'Leary M., Le B., Schmitz R.J., Manavella P., Li S., Weigel D., Pontes O., Ecker J.R., Chen X. DNA topoisomerase 1α promotes transcriptional silencing of transposable elements through DNA methylation and histone lysine 9 dimethylation in Arabidopsis. PLOS Genet. 2014;10: e1004446. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004446

Dolgosheina E.V., Morin R.D., Aksay G., Sahinalp S.C., Magrini V., Mardis E.R., Mattsson J., Unrau P.J. Conifers have a unique small RNA silencing signature. RNA. 2008;14:1508-1515. DOI: 10.1261/rna.1052008

Gao Z., Liu H.L., Daxinger L., Pontes O., He X., Qian W., Lin H., Xie M., Lorkovic Z.J., Zhang S., Miki D., Zhan X., Pontier D., Lagrange T., Jin H., Matzke A.J., Matzke M., Pikaard C.S., Zhu J.K. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. Nature. 2010;465(7294):106-109. DOI: 10.1038/nature09025

Groth M., Stroud H., Feng S., Greenberg M.V., Vashisht A.A., Wohlschlegel J.A., Jacobsen S.E., Ausin I. SNF2 chromatin remodeler-family proteins FRG1 and -2 are required for RNA-directed DNA methylation. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014;111:17666-17671. DOI: 10.1073/pnas.1420515111

Habu Y. Epigenetic silencing of endogenous repetitive sequences by MORPHEUS' MOLECULE1 in *Arabidopsis thaliana.* Epigenetics. 2010;5:562-565.

Heilersig H.J., Loonen A., Bergervoet M., Wolters A.M., Visser R.G. Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. Plant Mol. Biol. 2006;60:647-662. DOI: 10.4161/epi.5.7.12518

Herr A.J., Jensen M.B., Dalmay T., Baulcombe D.C. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. Science. 2005;308(5718):118-120.

Huang C., Zhu J. RNA splicing factors and RNA-directed DNA methylation. Biology (Basel). 2014;3:243-254. DOI: 10.3390/biology3020243

Huang Y., Kendall T., Mosher R.A. Pol IV-dependent siRNAproduction is reduced in *Brassica rapa.* Biology (Basel). 2013;2:1210-1223. DOI: 10.3390/biology2041210

Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters *in trans.* Plant J. 1999;17:131-140.

Johnson L.M., Du J., Hale C.J., Bischof S., Feng S., Chodavarapu R.K., Zhong X., Marson G., Pellegrini M., Segal D.J., Patel D.J., Jacobsen S.E. SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. Nature. 2014;507:124-128. DOI: 10.1038/nature12931

Khaitová L.C., Fojtová M., Křížová K., Lunerová J., Fulneček J., Depicker A., Kovařík A. Paramutation of tobacco transgenes by small RNA-mediated transcriptional gene silencing. Epigenetics. 2011;6:650-660.

Law J.A., Du J., Hale C.J., Feng S., Krajewski K., Palanca A.M., Strahl B.D., Patel D.J., Jacobsen S.E. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. Nature. 2013;498:385-389. DOI: 10.1038/nature12178

Liu Z.W., Shao C.R., Zhang C.J., Zhou J.X., Zhang S.W., Li L., Chen S., Huang H.W., Cai T., He X.J. The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014;111: 7474-7479. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003948

Luo C., Durgin B.G., Watanabe N., Lam E. Defining the functional network of epigenetic regulators in *Arabidopsis thaliana.* Mol. Plant. 2009;2:661-674. DOI: 10.1093/mp/ssp017

Lunerová-Bedrichová J., Bleys A., Fojtová M., Khaitová L., Depicker A., Kovařík A. Trans-generation inheritance of methylation patterns in a tobacco transgene following a post-transcriptional silencing event. Plant J. 2008;54(6):1049-1062. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03475.x

Ma C., Mitra A. Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco. Plant J. 2002;31:37-49.

Mari-Ordonez A., Marchais A., Etcheverry M., Martin A., Colot V., Voinnet O. Reconstructing *de novo* silencing of an active plant retrotransposon. Nat. Genet. 2013;45:1029-1039. DOI: 10.1038/ng.2703

Matzke A.J.M., Neuhuber F., Park Y.-D., Ambros P.F., Matzke M.A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. Mol. Gen. Genet. 1994;244:219-229.

Matzke M.A., Mosher R.A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nat. Rev. Genet. 2014;15:394-408. DOI: 10.1038/nrg3683

Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.J.M. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. EMBO J. 2000;19:5194-5201.

Meyer P. Transgenes and their contributions to epigenetic research. Int. J. Dev. Biol. 2013;57:509-515. DOI: 10.1387/ijdb.120254pm

Mosher R.A., Schwach F., Studholme D., Baulcombe D.C. Pol IVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008;105:3145-3150. DOI: 10.1073/pnas.0709632105

Mourrain P., van Blokland R., Kooter J.M., Vaucheret H. A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. Planta. 2007;225:365-379.

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell. 1990;2:279-289.

Nuthikattu S., McCue A.D., Panda K., Fultz D., De Fraia C., Thomas E.N., Slotkin R.K. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. Plant Physiol. 2013;162:116-1131. DOI: 10.1104/pp.113.216481

Park Y.-D., Papp I., Moscone E.A., Iglesias V.A., Vaucheret H., Matzke A.J.M. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. Plant J. 1996;9:183-194.

Penterman J., Uzawa R., Fischer R.L. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in Arabidopsis. Plant Physiol. 2007;145:1549-1557.

Pontier D., Picart C., Roudier F., Garcia D., Lahmy S., Azevedo J., Alart E., Laudié M., Karlowski W.M., Cooke R., Colot V., Voinnet O., Lagrange T. NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in *Arabidopsis*. Mol. Cell. 2012;48:121-132. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.07.027

Pooggin M. How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? Int. J. Mol. Sci. 2013;14:15233-15259. DOI: 10.3390/ijms140815233

Sallaud C., Meynard D., van Boxtel J., Gay C., Bès M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B., Rueb S., Delseny M., Guiderdoni E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. Theor. Appl. Genet. 2003;106:1396-1408.

Smith L.M., Pontes O., Searle I., Yelina N., Yousafzai F.K., Herr A.J., Pikaard C.S., Baulcombe D.C. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. Plant Cell. 2007;19:1507-1521.

Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. Genes Dev. 2006;20:759-771.

Vaucheret H. Promoter-dependent trans-inactivation in transgenic tobacco plants: kinetic aspects of gene silencing and gene reactivation. C.R. Acad. Sci. Paris. 1994;316:310-323.

Velásquez A.C., Chakravarthy S., Martin G.B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. Vis Exp. 2009;28:pii: 1292. DOI: 10.3791/1292

Wan L.C., Wang F., Guo X., Lu S., Qiu Z., Zhao Y., Zhang H., Lin J. Identification and characterization of small non-coding RNAs from Chinese fir by high throughput sequencing. BMC Plant Biology. 2012;12:146. DOI: 10.1186/1471-2229-12-146

Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. Cell. 1994;76: 567-576.

Wierzbicki A.T., Cocklin R., Mayampurath A., Lister R., Rowley M.J., Gregory B.D., Ecker J.R., Tang H., Pikaard C.S. Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. Genes Dev. 2012;26:1825-1836. DOI: 10.1101/gad.197772.112

Wu L., Zhou H., Zhang Q., Zhang J., Ni F., Liu C., Qi Y. DNA methylation mediated by a microRNA pathway. Mol. Cell. 2010;38:465-475. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.008

Yang Z., Ebright W.U., Yu B., Chen X. HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2′ OH of the 3′ terminal nucleotide. Nucl. Acids Res. 2006;34:667-675.

You W., Lorkovic Z.J., Matzke A.J., Matzke M. Interplay among RNA polymerases II, IV and V in RNA-directed DNA methylation at a low copy transgene locus in *Arabidopsis thaliana.* Plant Mol. Biol. 2013;82:85-96. DOI: 10.1007/s11103-013-0041-4

Zhang H., Tang K., Qian W., Duan C.G., Wang B., Zhang H., Wang P., Zhu X., Lang Z., Yang Y., Zhu J.K. An Rrp6-like protein positively regulates noncoding RNA levels and DNA methylation in Arabidopsis. Mol. Cell. 2014;54:418-430. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.019

Zhong X., Hale C.J., Law J.A., Johnson L.M., Feng S., Tu A., Jacobsen S.E. DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. Nat. Struct. Mol. Biol. 2012;19:870-875. DOI: 10.1038/nsmb.2354

Zhu Y., Rowley M.J., Bohmdorfer G., Wierzbicki A.T.A. SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. Mol. Cell. 2013;49:298-309. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.011

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):552-560
DOI 10.18699/VJ15.072

Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале и пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов трибы Triticeae

О.А. Орловская[1], И.Н. Леонова[2], И.Г. Адонина[2], Е.А. Салина[2], Л.В. Хотылева[1], В.К. Шумный[2]

[1] Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

В селекции культивируемых злаков существует ряд проблем, связанных с необходимостью создания форм, характеризующихся устойчивостью к болезням, вредителям и неблагоприятным условиям внешней среды. Расширение генетического разнообразия по генам устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам достигается за счет использования генофонда диких и культурных сородичей мягкой пшеницы. Для улучшения злаков по ряду хозяйственно ценных признаков методом отдаленной гибридизации получены гибридные линии мягкой пшеницы *T. aestivum* / *T. durum* и *T. aestivum* / *T. dicoccoides*, а также линии тритикале от скрещивания сортов гексаплоидных тритикале с геномно-замещенными формами мягкой пшеницы, у которых геном D замещен на геномы диплоидных эгилопсов. Цель исследования состояла в том, чтобы с помощью цитологического и молекулярно-генетического анализов выделить линии мягкой пшеницы и гексаплоидных тритикале с чужеродными интрогрессиями и оценить их цитологическую стабильность. Использование для генотипирования линий тритикале сравнительного анализа структуры хромосом методами GISH и FISH, микросателлитных и хромосом-специфичных маркеров позволило установить, что в процессе гибридизации тритикале с геномно-замещенными формами мягкой пшеницы происходит реорганизация генома, включающая как интрогрессию чужеродного материала, так и перестройки хромосом мягкой пшеницы, приводящие к новым сочетаниям генетических локусов. Показана эффективность использования микросателлитных маркеров, разработанных на основе анализа генома мягкой пшеницы, для характеристики созданных в результате межвидовой гибридизации линий *T. aestivum* / *T. durum* и *T. aestivum* / *T. dicoccum*. В хромосомах геномов A и B исследованных гибридных линий обнаружено от 4 до 12 транслокаций различной протяженности от *T. durum*, *T. dicoccum*. У изученного гибридного материала тритикале и пшеницы выявлена мейотическая стабильность, что создает предпосылки для сохранения чужеродных интрогрессий в ряду последующих поколений.

Ключевые слова: мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.); тритикале (× *Triticosecale* Wittmack); тетраплоидные виды пшеницы *T. durum*; *T. dicoccum*; геномно-замещенные формы мягкой пшеницы Авролата (AABBUU); Авродес (AABBSS) и Авротика (AABBM^tM^t); интрогрессивные линии пшеницы и тритикале; микроспорогенез; генотипирование.

Molecular-cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the tribe Triticeae species genetic material

O.A. Orlovskaya[1], I.N. Leonova[2], I.G. Adonina[2], E.A. Salina[2], L.V. Khotyleva[1], V.K. Shumny[2]

[1] Institute of Genetics and Cytology NASB, Minsk, Belarus
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

There are a number of problems in selection of cultivated cereals associated with the requirements to create forms with resistance to diseases, pests and unfavorable environmental conditions. The genetic diversity of genes for resistance to biotic and abiotic stresses can be increased by means of the gene pool of wild and cultivated wheat relatives. To improve agronomic traits in cereals, we have developed common wheat hybrid lines *T. aestivum* / *T. durum*, *T. aestivum* / *T. dicoccoides* and triticale lines by crossing hexaploid triticale with common wheat forms with the substitution of genome D for the genome of diploid *Aegilops* species. The aim of the study was to identify the lines of common wheat and hexaploid triticale with alien introgression using cytological and molecular-genetic analyses and evaluation of their cytological stability. Comparative analysis of the structure of chromosomes by GISH and FISH methods, microsatellite- and chromosome-specific markers revealed that hybridization of triticale with genome-substitution forms of wheat leads to the reorganization of the genome, including both the introgression of foreign material and wheat chromosome rearrangements, which lead to new combinations of genetic loci. The efficiency of wheat microsatellite markers to characterize of the *T. aestivum* / *T. durum*, *T. aestivum* / *T. dicoccum* interspecific hybrid lines was shown. From 4 to 12 translocations of different lengths from *T. durum* and *T. dicoccum* were identified in the chromosomes of A and B genomes in the hybrid lines. Meiotic stability of wheat and triticale hybrids was found.

УДК 577.21:631.11:[633.11+63./14]
Поступила в редакцию 13.07.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: O.Orlovskaya@igc.by

It creates prerequisites for preservation of alien genetic material in subsequent generations.

Key words: common wheat (*Triticum aestivum* L.); triticale (× *Triticosecale* Wittmack); tetraploid wheat species *T. durum*; *T. dicoccum*; genome-substitution forms of common wheat Avrolata (AABBUU); Avrodes (AABBSS) and Avrotica (AABBM^{t}M^t); introgression wheat and triticale lines; microsporogenesis; genotyping.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Орловская О.А., Леонова И.Н., Адонина И.Г., Салина Е.А., Хотылева Л.В., Шумный В.К. Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале и пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов трибы Triticeae. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):552-560. DOI 10.18699/VJ15.072

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A., Khotyleva L.V., Shumny V.K. Molecular-cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the tribe Triticeae species genetic material. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):552-560. DOI 10.18699/VJ15.072

Интенсивная селекция, связанная с внутривидовой гибридизацией, привела к сужению генетического разнообразия культивируемых злаков и использованию в производстве относительно небольшого количества наиболее продуктивных генотипов. В связи с этим возникает потребность в расширении генетической базы культурных видов за счет привлечения новых источников зародышевой плазмы из видов, произрастающих в природных условиях. Так, многие дикорастущие злаки содержат гены, детерминирующие устойчивость к грибным патогенам, насекомым, засолению почвы, засухе и высокое качество зерна (Schneider et al., 2008; Nevo, 2011). Одним из экологически безопасных методов расширения генофонда зерновых и получения нового в генетическом отношении исходного материала является интрогрессивная гибридизация, конечная цель которой – привлечение в геном культурных злаков богатого арсенала чужеродных генов от родственных дикорастущих и культурных видов.

При использовании генного пула видов *Triticum* с целью улучшения пшеницы и создания потенциально новой изменчивости приоритет отдается использованию видов, которые имеют геномы, близкие геномам A, B и D мягкой пшеницы. Это облегчает интрогрессию целевых генов и локусов количественных признаков в геном мягкой пшеницы. В связи с этим в скрещиваниях с сортами мягкой пшеницы *T. aestivum* (AABBDD) были использованы тетраплоидные виды пшеницы *T. durum*, *T. dicoccum* и *T. dicoccoides* (AABB), которые характеризуются скороспелостью, устойчивостью к полеганию, нетребовательностью к условиям произрастания, засухоустойчивостью и высоким содержанием белка в зерне (до 24 %), а также обладают генами, определяющими устойчивость к возбудителям различных болезней (Xie, Nevo, 2008).

В ряде работ по улучшению генофонда тритикале показано, что наиболее перспективным методом введения чужеродной информации в геном этой культуры может оказаться использование форм пшеницы, несущих чужеродные хромосомы, их фрагменты или даже целые геномы дикорастущих видов пшеницы (Arseniuk et al., 1998; Sodkiewicz et al., 2008). Ранее нами был предложен и экспериментально проверен новый способ интрогрессии генетического материала *Aegilops* L. в геном гексаплоидных тритикале (Орловская и др., 2007). Впервые в качестве посредника при переносе чужеродного материала эгилопсов использовали геномно-замещенные формы мягкой пшеницы сорта Аврора: Авролата (AABBUU), Авродес (AABBSS) и Авротика (AABBM^{t}M^t), у которых геном D замещен на геномы *Ae. umbellulata*, *Ae. speltoides* и *Ae. mutica* соответственно (Жиров, 1990).

Образование рекомбинантного генома пшеницы и тритикале путем гибридизации с дикорастущими злаками и близкородственными видами сопровождается целым комплексом структурных и функциональных перестроек, большая часть которых приводит к формированию гибридов с нестабильным геномом и ослабленной фертильностью. Выявлять чужеродный хроматин в составе гибридного генома, исследовать особенности его сохранения и наследования в ряде поколений позволяют такие цитологические и молекулярно-генетические методы анализа, как геномная *in situ* гибридизация (GISH), флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), микросателлитный анализ (SSR) и др. (Raina, Rani, 2001; Markova, Vyskot, 2009).

Целью работы было исследование характера интрогрессии чужеродного генетического материала у гибридных линий пшеницы и тритикале с использованием методов цитологического и молекулярно-генетического анализов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 11 сестринских линий поколения F_{6-7}, полученных от комбинаций скрещивания сортов мягкой пшеницы *T. aestivum* (Chinese Spring, Pitic S62, Белорусская 80) с образцами тетраплоидных видов *T. durum*, *T. dicoccum*; а также 10 линий, полученных при самоопылении гибридов от скрещивания озимых сортов гексаплоидных тритикале (Альмо, Идея, Модуль, Михась, НК-69) с геномно-замещенными формами мягкой пшеницы сорта Аврора: Авролата (AABBUU), Авродес (AABBSS) и Авротика (AABBM^{t}M^t). Данные формы пшеницы были созданы Е.Г. Жировым (Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко) и любезно предоставлены нам для работы (Жиров, 1990). Гибридные линии тритикале и пшеницы получены в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси и отобраны на основании изучения наследования морфологических признаков и продуктивности в поколениях F_1–F_4 (Орловская и др., 2007, 2011).

Для генотипирования линий тритикале использовали сравнительный анализ структуры хромосом методами FISH и GISH. FISH с зондами на основе клонированных

повторенных последовательностей ДНК Spelt1, Spelt52 и pSc119.2 проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina et al., 2006); GISH проводили согласно опубликованной методике (Schubert et al., 1998). В качестве пробы использовалась меченая геномная ДНК *S. cereale*, *Ae. umbellulata*, *Ae. mutica* в сочетании с 10–30-кратным избытком немеченой фрагментированной ДНК *T. aestivum*. Суммарную ДНК выделяли из листьев 5–7-дневных проростков либо из зерен по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). Для определения присутствия/отсутствия конкретных хромосом ржи у гибридных линий тритикале были использованы микросателлитные и хромосом-специфичные маркеры (Адонина и др., 2011).

Генотипирование линий *Triticum aestivum*/*Triticum durum* и *Triticum aestivum/Triticum dicoccum* осуществляли с помощью микросателлитных маркеров (WMC, GWM и GDM), специфичных для генома мягкой пшеницы (Somers et al., 2004; Ganal, Röder, 2007). Выделение ДНК, микросателлитный анализ, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и электрофорез фрагментов ПЦР проводили согласно ранее описанной процедуре (Леонова и др., 2005).

Микроспорогенез изучали на временных давленых препаратах. Для каждой комбинации скрещивания и исходной формы изучали по 30 материнских клеток пыльцы (МКП) метафазы I и по 50 МКП следующих стадий мейоза: анафазы I и II, метафазы II, тетрад. Анализировали по 3 растения каждого генотипа. Исследование препаратов проводили на микроскопе Ампливал (Карл Цейс, Йена) с объективом Апохромат 100× апертура 1,32 МИ. Статистический анализ данных по конъюгации хромосом в метафазе I проводили по стандартным методам с использованием модуля «описательная статистика» MS Excel 2007 (Microsoft, США). Количество хромосом, входящих в биваленты, рассчитывали как отношение числа хромосом, образующих биваленты, к общему числу хромосом, выраженное в процентах.

Результаты и обсуждение

Реорганизация геномного состава линий гексаплоидных тритикале при интрогрессии генетического материла от дикорастущих видов эгилопсов

Генотипирование линий тритикале было проведено методами цитологического и молекулярно-генетического анализа (табл. 1). GISH с ДНК *S. cereale* показала, что 8 из 10 линий несут по 14 хромосом ржи на диплоидный геном, транслокаций и рекомбинаций между пшеничными и ржаными хромосомами не обнаружено. В 2 из 7 линий, полученных от скрещивания тритикале с геномно-замещенной формой Авролата (AABBUU): 19 НК-69 × Авролата (рисунок, *а*, *б*) и 15 Идея × Авролата, присутствовали 12 хромосом ржи и по одной паре хромосом *Ae. umbellulata.* Присутствие генетического материала *Ae. mutica* в линии 21-1 Идея × Авротика ($AABBM^tM^t$) методом GISH выявлено не было (Адонина и др., 2010).

Для определения характера замещения хромосом ржи на хромосомы *Ae. umbellulata* в линиях 15 и 19 был проведен молекулярно-генетический анализ этих линий с использованием микросателлитных и хромосом-специфичных маркеров (Адонина и др., 2011). Установлено, что в линии 19 хромосома 1R ржи замещена на хромосому 1U *Ae. umbellulata*, в линии 15 обнаружено замещение хромосомы 2R на хромосому 2U.

Так как геном S *Ae. speltoides* эволюционно очень близок геному B мягкой пшеницы, проведение GISH с ДНК данного вида на линиях тритикале является затруднительным. Поэтому для выявления генетического материала *Ae. speltoides* в линиях тритикале, полученных от скрещивания с геномно-замещенной формой Авродес (AABBSS), использовали метод FISH с зондами Spelt1 и pSc119.2. Субтеломерный повтор Spelt1 − специфичный маркер генома *Ae. speltoides*. Одновременная гибридизация с зондом pSc119.2 позволяет идентифицировать индивидуальные хромосомы пшеницы и эгилопса (Badaeva et al., 1996; Schneider et al., 2003). На основании данных FISH и после их сравнения с результатами, полученными для родительских форм, установлено, что линия 24-5 несет терминальную транслокацию от *Ae. speltoides* в коротком плече хромосомы 1B. В линии 29 выявлена транслокация от *Ae. speltoides* в длинном плече хромосомы 7B (рисунок, *г*).

Кроме этого, использование зонда pSc119.2 позволило выявить в четырех линиях, полученных от скрещивания с Авролатой, и в линии, полученной от скрещивания с Авротикой, перестройки хромосомы 1B (рисунок, *в*). У линии 28-3 Альмо × Авролата предположительно произошла делеция терминального блока повтора pSc119.2. Наблюдаемые нами изменения в распределении блоков повтора pSc119.2 на хромосоме 1B у линий 21-1, 12, 20 и 23-4 могут свидетельствовать о произошедших в процессе создания гибридных линий тритикале перестройках между хромосомами пшеницы. Так, например, Е. Бадаева с коллегами (Badaeva et al., 2007) выявили в сумме около 20 типов перестроек у разных образцов мягкой пшеницы и тритикале. Следует отметить, что наибольшее количество перестроек (у 7 из 10 изученных линий) нами было выявлено в первой гомеологической группе хромосом. Значительная частота перестроек, затрагивающих хромосомы первой гомеологической группы гексаплоидной пшеницы, отмечалась и в других работах: спонтанное замещение хромосомы 1B на хромосому 1R ржи (Friebe et al., 1996); транслокация 1RS·1BL, в настоящее время присутствующая во многих сортах мягкой пшеницы (Rabinovich, 1998); терминальные транслокации в коротком плече хромосомы 1B у линий *T. aestivum* с генетическим материалом *Ae. speltoides*. Высокая частота хромосомных замещений и транслокаций в первой гомеологической группе указывает на значительную близость хромосом видов, участвующих в скрещивании, определяющую их высокую компенсационную способность.

Таким образом, в процессе гибридизации гексаплоидных тритикале с геномно-замещенными формами мягкой пшеницы происходит реорганизация генома в целом, включающая как интрогрессию чужеродного материала, так и перестройки хромосом мягкой пшеницы, приводящие к новым сочетаниям генетических локусов.

Анализ геномного состава гибридных линий мягкой пшеницы

Для определения локализации и протяженности фрагментов генетического материала *T. durum* и *T. dicoccum* в геноме гибридных линий мягкой пшеницы было использовано 140 микросателлитных маркеров, картированных на генетических картах хромосом мягкой пшеницы *T. aestivum* (Леонова и др., 2014). Для анализа хромосом геномов A и B использовано от 7 до 12 маркеров на хромосому. Хромосомы генома D были также проверены ограниченным количеством маркеров для выявления возможных перестроек. Анализ продуктов ПЦР маркеров, специфичных для мягкой пшеницы, показал, что в среднем более 87 % маркеров геномов A и B амплифицируют фрагменты у образцов тетраплоидных видов, использованных для создания линий. Маркеры, специфичные для хромосом генома D, показали отсутствие амплификации фрагментов у тетраплоидных пшениц *T. durum* и *T. dicoccum*.

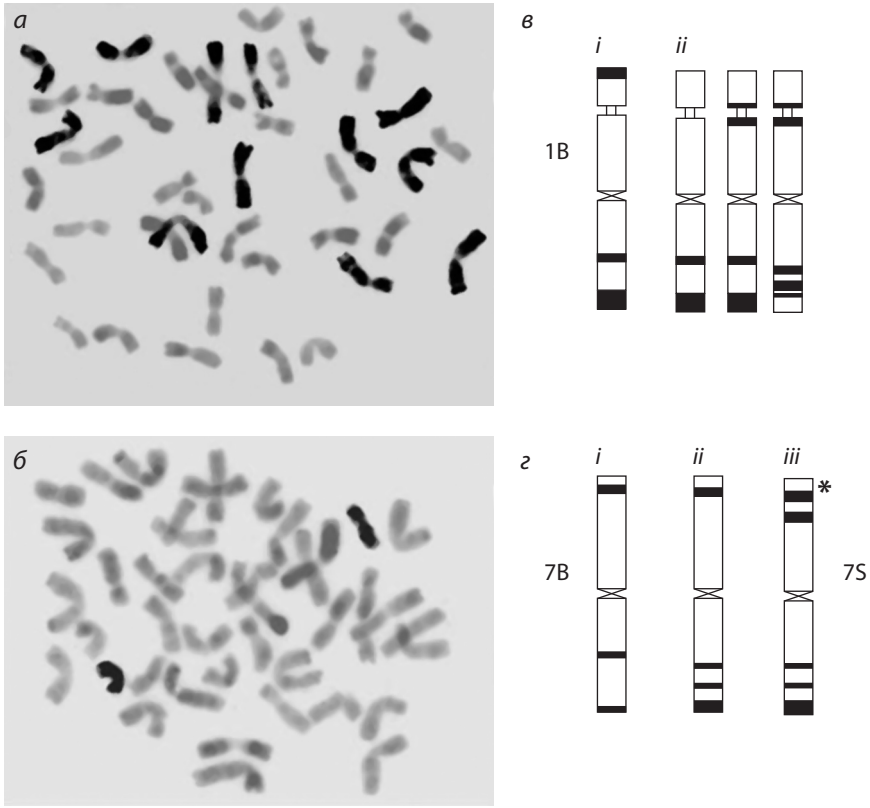
Из литературных данных известно, что SSR маркеры, разработанные на основе генома гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*, активно используются для изучения других видов пшеницы и межвидовых гибридов (Kuleung et al., 2004; Leonova et al., 2009). Ряд микросателлитных маркеров был использован для построения и интеграции в молекулярно-генетические карты хромосом пшениц различной плоидности и других видов злаков (Adonina et al., 2005), в том числе карт хромосом *T. dicoccoides* и консенсусных карт *T. durum* (Peng et al., 2000). При этом степень эффективности данных маркеров для характеристики чужеродных генотипов и межвидовых гибридов достаточно высока независимо от уровня гомеологии хромосом.

Оценка полиморфизма SSR маркеров у родительских сортов (Chinese Spring, Pitic S62, Белорусская 80), использованных в данной работе при создании линий, в сравнении с тетраплоидными пшеницами *T. durum* и *T. dicoccum*, показывает, что большинство использованных маркеров (в среднем 75,3 и 87,5 % для гено-

Таблица 1. Результаты генотипирования линий, полученных от скрещивания тритикале с геномно-замещенными формами пшеницы Аврора

Линия (комбинация скрещивания)	Геномный состав (гаплоидный); хромосомные перестройки
23-4 (Идея × Авролата)	w14 + r7; 1B (рисунок, *в*)
15 (Идея × Авролата)	w14 + r6 + u1; 2R(2U)
19 (НК-69 × Авролата)	w14 + r6 + u1; 1R(1U)
28-3 (Альмо × Авролата)	w14 + r7; 1B (рисунок, *в*)
12 (Альмо × Авролата)	w14 + r7; 1B (рисунок, *в*)
20 (Михась × Авролата)	w14 + r7; 1B (рисунок, *в*)
27-2 (Модуль × Авролата)	w14 + r7
29 (Модуль × Авродес)	w14 + r7; T7BS/7SL (рисунок, *г*)
24-5 (Альмо × Авродес)	w14 + r7; T1SS/1BS · 1BL
21-1 (Идея × Авротика)	w14 + r7; 1B (рисунок, *в*)

w – хромосомы *T. aestivum*; r – хромосомы *S. cereale*; u – хромосомы *Ae. umbellulata*.



Анализ линий тритикале с интрогрессиями от видов эгилопсов с помощью GISH и FISH.

а – линия 19 (НК-69 × Авролата) – GISH с ДНК *S. cereale*; *б* – линия 19 – GISH с ДНК *Ae. umbellulata*; *в* – идиограмма, демонстрирующая распределение пробы pSc119.2 на хромосоме 1B: *i* – *T. aestivum*; *ii* – линия 28-3 (Альмо × Авролата) – левый гомолог, линии 21-1 (Идея × Авротика), 12 (Альмо × Авролата), 20 (Михась × Авролата) – центральный гомолог, линия 23-4 (Идея × Авролата) – правый гомолог; *г* – идиограмма, демонстрирующая распределение пробы pSc119.2: *i* – на хромосоме 7B *T. aestivum*; *ii* – на хромосоме 7B с транслокацией T7BS/7SL у линии 29 (Модуль × Авродес); *iii* – на хромосоме 7S *Ae. speltoides*. Звездочкой обозначен сайт гибридизации с зондом Spelt1.

Рисунок из: (Adonina et al., 2011).

мов A и B соответственно) являются полиморфными, при этом порядка 70 % маркеров амплифицировали фрагменты в геноме тетраплоидных видов. Такой уровень полиморфизма позволяет не только выявлять участки интрогрессии чужеродного генома, но и оценивать их размеры. Однако отмечается разный уровень полиморфизма маркеров для отдельных хромосом. Так, например, все использованные в анализе маркеры, специфичные для хромосом 1B, 5B и 7B, были полиморфны независимо от родительского сорта мягкой пшеницы. Наиболее низкий уровень полиморфизма отмечен для маркеров, специфичных для хромосом 3A, 4A и 5A, и составлял в среднем 63 %.

Для определения хромосомной локализации и протяженности фрагментов генома *T. durum* и *T. dicoccum* было использовано от 5 до 11 полиморфных маркеров на каждую хромосому геномов A и B. Результаты генотипирования показали, что гибридные линии содержат от 4 до 12 фрагментов тетраплоидных пшениц (табл. 2). Для гибридных линий, полученных с участием *T. durum*, установлены различия по числу, хромосомной локализации и длине чужеродных фрагментов как внутри одной и той же комбинации скрещивания, так и между комбинациями, полученными на основе разных сортов мягкой пшеницы. Следует отметить значительные различия по числу и хромосомной локализации интрогрессированных фрагментов для линий прямой и обратной комбинаций скрещивания с участием сорта Chinese Spring и *T. durum*. Так, линии прямой комбинации скрещивания содержат 6 фрагментов генома *T. durum*, в то время как в обратной комбинации обнаруживается не менее 8. Кроме того, у линий прямой комбинации скрещивания не выявлено фрагментов чужеродного генома в хромосомах 1B, 5A, 7A и 6-й гомеологичной группы хромосом.

Можно отметить, что направление скрещивания оказывает влияние и на успех межвидовой гибридизации. Анализ полученных нами ранее результатов показал, что при скрещивании гексаплоидных и тетраплоидных пшениц оплодотворение протекает более успешно, когда опылителем является многохромосомный вид. Так, в комбинации, в которой в качестве материнского компонента скрещивания использовали *T. durum*, а в качестве отцовского – сорт пшеницы Chinese Spring, завязываемость составила 24,7 %, тогда как в обратной – только 1,4 %. Однако выполненность завязавшихся зерновок выше в комбинациях, в которых в роли опылителя выступали тетраплоидные виды: ни в одной такой комбинации скрещивания не выявлено зерновок без эндосперма (Khotyleva et al., 2010). В обратных же комбинациях зерновки были более морщинистые, с плохо выполненным эндоспермом, а у части из них эндосперм практически отсутствовал. Генотипирование гибридных линий *T. aestivum/T. durum* и *T. aestivum/T. dicoccum* выявило хромосомы с высокой и низкой частотой интрогрессии геномов тетраплоидных пшениц в хромосомы мягкой пшеницы. Так, более 80 % гибридных линий из комбинаций скрещивания с *T. durum* содержат фрагменты интрогрессий в хромосомах 1A, 2A, 3A, 3B, 5B и 7B.

Низкий уровень интрогрессии характерен для хромосом 4A и 4B, при этом у линий, полученных с участием *T. dicoccum*, не выявлены фрагменты интрогрессии в хромосоме 4A.

Также следует отметить, что фрагменты генома тетраплоидных пшениц в хромосомах 5A и 7B обнаруживаются только в длинных плечах хромосом. Анализ локализации чужеродных фрагментов в сочетании с литературными данными о локализации генов устойчивости к грибным патогенам (McIntosh et al., 2013) позволяет предположить, что «целевые» локусы, определяющие устойчивость гибридных линий, локализованы в хромосомах, характеризующихся высокой частотой интрогрессий. Результаты молекулярного анализа свидетельствуют о том, что 4 гибридные линии (183/2-2 и 183/4-6 из комбинации CS/*T. durum* и 208-3 и 213-1 из комбинации Pitic S62/*T. dicoccum*) имеют высокое сходство как по хромосомной локализации фрагментов чужеродного генома, так и по протяженности этих фрагментов (табл. 2). Проведенное ранее кариотипирование этих линий методом C-бэндинга указывает на то, что они практически не отличаются друг от друга по рисункам окрашивания хромосом (Леонова и др., 2013).

Анализ протяженности фрагментов генома тетраплоидных пшениц не выявил закономерностей в длинах фрагментов в зависимости от сорта мягкой пшеницы, использованного для гибридизации. Также не отмечено существенных различий по числу и протяженности интрогрессированных фрагментов, характерных для хромосом геномов A и B. По-видимому, это связано с достаточно высокой степенью гомеологии хромосом A и B геномов мягкой пшеницы и видов, использованных в гибридизации, и их высокой рекомбинационной способностью.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования микросателлитных маркеров, разработанных на основе генома мягкой пшеницы, для характеристики линий *T. aestivum / T. durum* и *T. aestivum / T. dicoccum*, созданных в результате межвидовой гибридизации. В геноме гибридных линий выявлено от 4 до 12 фрагментов *T. durum* и *T. dicoccum* различной протяженности в хромосомах A и B геномов.

Оценка цитологической стабильности гибридных линий тритикале и пшеницы

Главным фактором, ограничивающим практическое применение отдаленных гибридов, является их нестабильность, ведущая к быстрой потере чужеродного генетического материала. В основе этой нестабильности лежат нарушения мейотического цикла гибридных растений, вызывающие формирование нефункциональных гамет. Известно, что в геноме отдаленных гибридов и амфидиплоидов присутствуют системы генетического контроля мейоза разных родительских видов, которые не только действуют самостоятельно в гибридном геноме, но и взаимно влияют друг на друга (Naranjo et al., 1979; Lelley, Larter, 1980). В связи с этим нами проведен анализ поведения хромосом в мейозе у гибридных линий пшеницы и тритикале с целью оценки их цитологической стабильности.

Анализ стадии метафазы I выявил высокий уровень образования бивалентов как у гибридных линий пшеницы, так и тритикале (табл. 3). Количество хромосом, входящих

Таблица 2. Число интрогрессированных фрагментов *T. durum* и *T. dicoccum* и их хромосомная локализация в геноме гибридных линий мягкой пшеницы

Комбинация скрещивания	Линия	Хромосома/геном													
		1		2		3		4		5		6		7	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Chinese Spring × *T. durum*	183/2-2	L	–	+	–	L	S	–	–	–	L	–	–	–	L
	183/4-6	L	–	+	–	L	S	–	–	–	L	–	–	–	L
T. durum × Chinese Spring	190/4-1	+	+	+	L	L	+	–	–	L	L	L	S	L	L
	190/5-3	L	+	+	L	–	S	–	–	L	L	–	+	L	L
	190/6-1	+	–	+	L	S	S	–	–	L	L	–	+	L	L
	191/3-3	+	–	+	–	+	S	–	–	L	L	–	+	L	L
	195-3	L	+	+	+	+	+	–	–	L	+	L	+	+	L
	196-1	L	+	+	+	L	+	–	–	L	+	L	+	+	L
	200-3	L	+	S	–	L	L	–	–	L	L	–	–	–	L
	202-2	S	–	+	S	L	S	–	S	–	L	–	+	L	+
T. durum × Белорусская 80	221-1	+	–	–	+	L	+	L	S	L	–	L	+	S	L
	226-7	S	S	L	–	+	+	L	–	–	L	+	+	–	–
Pitic S62 × *T. dicoccum*	206-2	+	+	–	+	L	S	–	S	L	L	L	+	+	–
	208-3	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	L	L
	213-1	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	L	L

L/S – наличие фрагментов генома *T. durum* или *T. dicoccum* в длинном/коротком плечах хромосомы; «+» – наличие фрагментов в обоих плечах хромосом; «–» – отсутствие фрагментов в обоих плечах хромосом.

в состав бивалентов, варьировало у линий пшеницы от 97,1 до 99,7 %, у тритикале – от 95,7 до 99,4 %. У всех проанализированных линий наблюдалось явное преобладание закрытых бивалентов над открытыми, что свидетельствует о высокой интенсивности процесса синапсиса гомологов. Наибольшим числом закрытых бивалентов характеризовались линия пшеницы 190/6-1 *T. durum* × Chinese Spring и линия тритикале 29 комбинации Модуль × Авродес (табл. 3).

Основным типом нарушений на этой стадии мейоза являлось наличие унивалентных хромосом. Среди материнских клеток пыльцы с унивалентами у подавляющего большинства гибридных линий самым многочисленным классом было сочетание 20II+2I. Максимальное число унивалентов, обнаруженное для исследованного материала, равно 4, чаще всего такие клетки встречались у линий пшеницы комбинации *T. durum* × Chinese Spring и линии тритикале 24-5 Альмо × Авродес. Таким образом, анализ характера поведения хромосом на стадии метафазы I мейоза линий пшеницы и тритикале с включением чужеродного генетического материала выявил высокую степень бивалентной конъюгации, что позволяет предположить незначительное количество нарушений на последующих стадиях мейоза.

Если исходить из положения, что образующиеся в метафазе I униваленты являются основной причиной аномалий на последующих стадиях мейоза, то на стадии анафазы I у данных гибридных линий следует ожидать незначительного количества нарушений. Одним из основных нарушений мейоза у исследованного материала в анафазе I являлось отставание одной или нескольких хромосом от основных групп хромосом, разошедшихся к полюсам деления. В МКП с нарушениями количество отставших хромосом варьировало от 1 до 5, причем максимальное количество унивалентов отмечено только у одной линии пшеницы, 196-1, комбинации *T. durum* × Chinese Spring и одной линии тритикале, 12, Альмо × Авролата. У большинства изученных линий самый многочисленный класс составили МКП с одной отстающей хромосомой. Кроме этого, основного, нарушения поведения хромосом на исследуемой стадии у всех линий пшеницы отмечены МКП с хромосомными мостами, количество которых варьировало от 5,0 до 22,0 %. Хроматидные мосты отмечены для 4 из 7 изученных линий тритикале. У растений гибридной комбинации Альмо × Авролата такого рода нарушения встречались чаще всего (6,5 %). Количество МКП без нарушений на стадии анафазы I для пшеницы было в интервале от 52,5 до 85,7 %, для тритикале – от 30 до 88,5 % (табл. 4). Оба мейотических деления следуют одно за другим достаточно быстро, и микроядра, образуемые отставшими в первом делении хромосомами, сохраняются в цитоплазме в течение второго деления. В этих же клетках имеют место отставание хромосом и образование из них микроядер в процессе второго деления, вследствие чего нарушения первого и второго делений суммируются. Основным нарушением в метафазе II, как и в метафазе I, является наличие унивалентных хромосом, не включенных в метафазные пластинки. Расхождение хромосом к полюсам во втором делении мейоза (анафаза II) сопровождалось отставанием отдельных

Таблица 3. Конъюгация хромосом в метафазе I гибридных линий мягкой пшеницы и тритикале

Гибридная комбинация	Линия	Среднее число на клетку				Количество хромосом, входящих в биваленты, %
		Биваленты			Униваленты	
		закрытые	открытые	всего		
Линии пшеницы						
Рассвет × *T. dicoccoides к* 5199	29	18,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2	20,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	98,3
T. dicoccoides × Фестивальная	15-7	19,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	20,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,7
	16-5	19,0 ± 0,4	1,9 ± 0,4	20,9 ± 0,1	0,2 ± 0,2	99,5
Chinese Spring × *T. durum*	183/2-2	18,8 ± 0,3	1,9 ± 0,3	20,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	99,0
	184/1-6	18,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	20,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,9
T. durum × Chinese Spring	190/5-3	18,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	20,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,9
	190/6-1	19,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	20,9 ± 0,04	0,1 ± 0,1	99,7
	196-1	16,8 ± 0,3	3,6 ± 0,3	20,4 ± 0,1	1,1 ± 0,2	97,3
	200-3	19,3 ± 0,3	1,4 ± 0,2	20,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	98,7
T. durum × Белорусская 80	221-1	19,2 ± 0,3	1,6 ± 0,3	20,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,9
	226-7	18,1 ± 0,3	2,4 ± 0,3	20,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2	97,6
Pitic S 62 × *T. dicoccum*	206-2	16,5 ± 0,3	3,9 ± 0,3	20,4 ± 0,1	1,1 ± 0,3	97,1
	208-3	18,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2	20,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,7
	213-1	18,1 ± 0,3	2,6 ± 0,3	20,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	98,9
Линии тритикале						
Альмо × Авролата	12	16,3 ± 0,3	4,1 ± 0,3	20,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	96,8
Альмо × Авродес	24-5	17,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	20,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	96,8
Модуль × Авролата	27-2	17,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2	20,8 ± 0,1	0,4 ± 0,2	98,9
Модуль × Авродес	29	17,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	20,9 ± 0,8	0,3 ± 0,2	99,4
Михась × Авролата	20	17,1 ± 0,3	3,6 ± 0,3	20,6 ± 0,9	0,7 ± 0,2	98,3
Идея × Авротика	21-1	17,5 ± 0,3	3,1 ± 0,3	20,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	98,4
Идея × Авролата	23-4	17,2 ± 0,3	2,9 ± 0,3	20,1 ± 0,2	1,8 ± 0,3	95,7

хромосом, нарушением синхронности, образованием мостов. В целом число отставших хромосом в анафазе II осталось на уровне предыдущей стадии и варьировало у линий пшеницы от 1 до 4 (у тритикале данная стадия не анализировалась). Чаще всего встречались группы клеток с одной отставшей хромосомой. Количество МКП с хромосомными мостами изменялось от 1,7 до 12,0 %, причем у 4 линий данный тип нарушений не был выявлен. Как следствие этого, частота встречаемости МКП с мостами во втором делении значительно меньше, по сравнению с первым. У всего исследованного материала пшеницы обнаружены клетки с асинхронным делением. Максимальное число таких МКП характерно для линии 184/1-6 (20,7 %), минимальное – для линий 16-5 и 200-3 (1,7 %). Количество МКП без нарушений на стадии анафазы II было достаточно велико и варьировало от 55,0 до 80,0 % (табл. 4).

Стадия тетрад является заключительной, и количество МКП без нарушений на этой стадии (так называемый мейотический индекс) – важный показатель нормального течения всего мейоза. Для линий *T. aestivum* с интрогрессией генетического материала тетраплоидных пшениц максимальный мейотический индекс (95 %) отмечен у линии 29 комбинации Рассвет × *T. dicoccoides* и линии 208-3 Pitic S62 × *T. dicoccum*, в то время как самый низкий показатель принадлежит линии 206-2 комбинации Pitic S62 × *T. dicoccum* (60,0 %) (табл. 4). Основным нарушением на данной стадии мейоза является наличие в тетрадах микроядер, количество которых варьировало в исследованном материале от 1 до 7, однако чаще всего образовывались тетрады с 1 и 2 микроядрами. Три линии, 15-7, 196-1, 206-2, имели МКП, содержащие от 5 до 7 микроядер, но частота встречаемости таковых была очень низкой и находилась на уровне 1,2–1,3 % от общего числа проанализированных клеток. Другим нарушением на стадии тетрад было наличие триад (1,2 %), которые наблюдались только у одной линии – 184/1-6.

Следует отметить, что линии с высоким показателем хромосомных ассоциаций на ранних стадиях мейоза, как правило, имели более высокое значение мейотического индекса. Изучение особенностей поведения хромосом в мейозе гибридных линий, полученных от скрещивания сортов *T. aestivum* с тетраплоидными видами пшениц, выявило небольшое количество аномальных клеток не

Таблица 4. Характеристика стадий мейоза гибридных линий мягкой пшеницы и тритикале

Гибридная комбинация	Линия	МКП без нарушений, %			Мейотический индекс, %
		Анафаза I	Метафаза II	Анафаза II	
Линии пшеницы					
Рассвет × *T. dicoccoides* к 5199	29	81,7	77,4	87,8	95,0
T. dicoccoides × Фестивальная	15-7	78,3	80,0	84,0	90,0
	16-5	80,0	72,0	91,6	91,0
Chinese Spring × *T. durum*	183/2-2	58,0	60,0	76,0	92,4
	184/1-6	70,0	67,2	69,1	87,5
T. durum × Chinese Spring	190/5-3	80,0	56,9	90,0	91,2
	190/6-1	76,0	68,8	84,0	93,3
	196-1	52,5	69,6	80,0	75,0
	200-3	74,0	62,5	78,3	88,7
T. durum × Белорусская 80	221-1	85,7	56,9	84,3	86,3
	226-7	70,6	55,6	77,3	98,7
Pitic S 62 × *T. dicoccum*	206-2	57,5	38,9	56,8	60,0
	208-3	64,0	67,6	70,0	95,0
	213-1	72,0	65,5	58,0	87,5
Линии тритикале					
Альмо × Авролата	12	60,9	44,2	–	32,5
Альмо × Авродес	24-5	66,0	60,0	–	38,9
Модуль × Авролата	27-2	70,0	75,0	–	76,0
Модуль × Авродес	29	88,5	76,0	–	80,2
Михась × Авролата	20	80,0	74,0	–	68,8
Идея × Авротика	21-1	73,8	95,0	–	70,0
Идея × Авролата	23-4	30,0	46,0	–	44,0

только на стадии метафазы I, но и на заключительной стадии тетрад, которая является отражением нарушений в поведении хромосом на всех предшествующих стадиях.

Доля нормальных тетрад у изученного материала тритикале варьировала в более широких пределах и была несколько ниже, чем у линий пшеницы (табл. 4). Это не противоречит данным литературы, так как известно, что у тритикале, являющегося эволюционно молодым пшенично-ржаным амфиплоидом, цитологическая стабильность снижена (Ригин, Орлова, 1977). Максимальный мейотический индекс отмечен для линий 29 и 27-2 (80,2 и 76 % соответственно). Число микроядер в одной тетраде у данных линий не превышало 3, что говорит о стабилизации мейоза у этих образцов. Однако из 7 изученных линий для 3 (12, 24-5 и 23-4) выявлен невысокий процент нормальных тетрад (32,5–44 %). Количество микроядер в тетрадах данных линий достигало 7, однако чаще всего образовывались спорады с 1 или 2 микроядрами. Триады обнаружены только у линии 12 комбинации Альмо × Авролата. Полученные данные свидетельствуют о незавершенности процесса стабилизации мейоза у данного материала, в частности стадий, следующих за метафазой I. Поскольку спаривание хромосом в метафазе I и их поведение на последующих стадиях мейоза регулируются разными генетическими системами, данный факт можно объяснить нарушением регуляции поведения хромосом на стадиях метафазы II – анафазы II, что приводит к увеличению аномальных МКП и низкому уровню нормальных тетрад.

Анализ характера поведения хромосом в метафазе I мейоза показал высокий уровень образования бивалентов у всех гибридных линий пшеницы F_{6-7} и тритикале F_{12}. Для большинства изученных линий выявлено незначительное количество аномальных клеток и на последующих стадиях мейоза, включая заключительную стадию тетрад.

Таким образом, использование молекулярно-цитологических и молекулярно-генетических подходов позволило выявить интрогрессию чужеродного генетического материала в геноме линий тритикале и пшеницы, созданных в результате отдаленной гибридизации. Выявленная мейотическая стабильность обеспечивает формирование у изученного гибридного материала полноценных гамет и тем самым создает предпосылки для сохранения чужеродных интрогрессий в ряду последующих поколений.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследо-

ваний (гранты № Б14Р-013, № Б15СО-030); Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-90000, проект № 18 Совместных проектов фундаментальных исследований НАН Беларуси и СО РАН).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Адонина И.Г., Орловская О.А., Терещенко О.Ю., Корень Л.В., Хотылева Л.В., Шумный В.К., Салина Е.А. Формирование хозяйственно ценных признаков у линий гексаплоидных тритикале с интрогрессиями от дикорастущих видов эгилопсов в зависимости от геномного состава. Генетика. 2011;47(4):516-526.

Жиров Е.Г. Геном пшеницы: исследование и перестройка: Автореф. дис. … д-ра биол. наук. Киев, 1990.

Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Орловская О.А., Родер М.С., Хотылева Л.В., Салина Е.А., Шумный В.К. Сравнительная характеристика гибридных линий *Triticum aestivum/Triticum durum* и *Triticum aestivum*/*Triticum dicoccum* по геномному составу и устойчивости к грибным болезням в различных экологических условиях. Генетика. 2013;49(11):1276-1283.

Леонова И.Н., Добровольская О.Б., Каминская Л.Н., Адонина И.Г., Корень Л.В., Хотылева Л.В., Салина Е.А. Молекулярный анализ линий тритикале, содержащих различные системы *Vrn* генов, с помощью микросателлитных маркеров и гибридизации *in situ*. Генетика. 2005;41(9):1236-1243.

Леонова И.Н., Салина Е.А., Орловская О.А., Хотылева Л.В., Шумный В.К. Использование SSR-маркеров для характеристики гибридных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *T. durum* и *T. dicoccum*. Молекуляр. и прикл. генетика. 2014;18: 61-69.

Орловская О.А., Каминская Л.Н., Хотылева Л.В. Интрогрессия генетического материала эгилопса в геном гексаплоидных тритикале. Генетика. 2007;43(3):363-369.

Орловская О.А., Корень Л.В., Хотылева Л.В. Морфологический анализ гибридов пшеницы, созданных посредством отдаленной гибридизации в трибе Triticeae. Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011;3:29-33.

Ригин Б.В., Орлова И.Н. Пшенично-ржаные амфидиплоиды. Л.: Колос, 1977.

Adonina I.G., Orlovskaya O.A., Tereshchenko O.Yu., Koren L.V., Khotyleva L.V., Salina E.A. Introgression of *Aegilops* genetic material into the genome of hexaploid triticale and influence of genome structure on formation of economic-valuable traits. Plant genetics, genomics, and biotechnology: Proc. Intern. Conf. 7–10 June. Novosibirsk, 2010.

Adonina I.G., Orlovskaya O.A., Tereshchenko O.Yu., Koren L.V., Khotyleva L.V., Shumny V.K., Salina E.A. Development of commercially valuable traits in hexaploid *Triticale* lines with *Aegilops* introgressions as dependent on the genome composition. Rus. J. Genet. 2011;47(4):449-457. DOI: 10.1134/S1022795411040028

Adonina I.G., Salina E.A., Pestsova E.G., Röder M.S. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Aegilops* species and determination of chromosomal localizations of microsatellites in the S genome. Genome. 2005;48(6):959-970. DOI: 10.1139/g05-072

Arseniuk E., Gruszecka D., Tarkowski Cz. Analysis of *Stagonospora nodorum* blotch resistance in hybrids of triticale, wheat, rye, *Aegilops* spp., *Agrotriticum* sp., and *Dasypyrum* sp. Proc. 4th Int. Triticale Symp. Alberta, 26–31 July 1998;1:303-311.

Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskyi V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. Genome. 2007;50(10):907-926. DOI: 10.1139/G07-072

Badaeva E.D., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequence on chromosomes of diploid species. Genome. 1996;39(2):293-306.

Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests. Euphytica. 1996;91:59-87. DOI: 10.1007/BF00035277

Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. Genomics Assisted Crop Improvement. Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. Springer, 2007;2:1-24.

Khotyleva L., Koren L., Orlovskaya O. Use of *Triticeae* tribe species for expanding and enriching genetic resources of *Triticum aestivum*. Proc. 8th Int. Wheat Conf. St. Petersburg, 1–4 June 2010.

Kuleung C., Baenziger P.S., Dweikat I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. Theor. Appl. Genet. 2004;108(6): 1147-1150. DOI: 10.1007/s00122-003-1532-5

Lelley T., Larter E.N. Meiotic regulation in triticale: interaction of the rye genotype and specific wheat chromosomes on meiotic pairing in the hybrid. Can. J. Genet. Cytol. 1980;22(1):1-6.

Leonova I.N., Röder M.S., Nasyrova F. The application of wheat microsatellite markers for the detection of interspecific variation in tetraploid *Aegilops* species with C and U genomes. Cereal Res. Commun. 2009;37(3):335-343. DOI: 10.1556/CRC.37.2009.3.2

Markova M., Vyskot B. New horizons of genomic *in situ* hybridization. Cytogenet. Genome Res. 2009;126(4):368-375. DOI: 10.1159/000275796

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013. Available at: http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/

Naranjo T., Lacadena J.R., Giraldez R. Interaction between wheat and rye genomes on homologous and homoeologous pairing. Z. Pflanzenzuchtung. 1979;82(4):289-305.

Nevo E. Triticum. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Cereals. Ed. C. Kole. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

Peng J., Korol A.B., Fahima T., Röder M.S., Ronin Y.I., Li Y.C., Nevo E. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasi-linkage. Genome Res. 2000;10(10):1509-1531. DOI: 10.1101/gr.150300

Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995;91:1001-1007.

Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. Euphytica. 1998;100: 323-340.

Raina S.N., Rani V. GISH technology in plant genome research. Methods Cell Sci. 2001;23(1-3):83-104. DOI: 10.1023/A:1013197705523

Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.R. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. Genome. 2006;49(8):1023-1035. DOI: 10.1139/g06-050

Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. Plant Breed. 2003;122(5):396-400. DOI: 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x

Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. Euphytica. 2008;163(1):1-19. DOI: 10.1007/s10681-007-9624-y

Schubert I., Shi F., Fuchs J., Endo T.R. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. Plant J. 1998;14:489-495.

Sodkiewicz W., Strzembicka A., Apolinarska B. Chromosomal location in triticale of leaf rust resistance genes introduced from *Triticum monococcum*. Plant Breed. 2008;127(4):364-367. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01485.x

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

Xie W., Nevo E. Wild emmer: genetic resources, gene mapping and potential for wheat improvement. Euphytica. 2008;164(3):603-614. DOI: 10.1007/s10681-008-9703-8

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):561-573
DOI 10.18699/VJ15.073

Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений

В.Ф. Аджиева[1], О.Г. Бабак[1], О.Ю. Шоева[2], А.В. Кильчевский[1], Е.К. Хлесткина[2, 3]

[1] Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Разнообразная окраска плодов и семян растений определяется наличием двух важных типов пигментов – каротиноидов (красная, оранжевая, желтая) и антоцианов (фиолетовая, синяя, красная). Они принадлежат к двум группам вторичных метаболитов – изопреноидам и флавоноидам. В последнее время наблюдается повышенный интерес к изучению генетических механизмов, контролирующих признаки окраски у растений, в связи с антиоксидантными и антимикробными свойствами определенных пигментов и их бесцветных предшественников, употребляемых с растительной пищей. Гены, кодирующие ферменты, необходимые для последовательных превращений исходных органических молекул в конечные пигментные соединения, относят к группе структурных генов. Факторы, активирующие экспрессию структурных генов и контролирующие синтез определенных пигментов в конкретный момент времени в какой-либо части растения, относят к регуляторным генам биосинтеза. Накопленные к настоящему моменту данные в области генетики растений свидетельствуют о том, что наблюдаемое на фенотипическом уровне межвидовое и внутривидовое разнообразие по признакам окраски связано именно с регуляторными генами. Создание в предшествующие годы богатых коллекций и точных генетических моделей по признакам окраски у двудольных и однодольных растений, а также развитие молекулярно-генетических методов исследования растений позволили детально изучить механизмы генетической регуляции синтеза пигментных соединений на молекулярном уровне. В данной статье особенности регуляции биосинтеза каротиноидов проиллюстрированы на примере их образования в плодах семейства Solanaceae. Генетическая регуляция синтеза различных флавоноидных пигментов показана на примере изучения окраски семян у растений семейства Poaceae. В заключительной части работы обсуждается перспектива практического использования регуляторных генов, контролирующих окраску плодов и семян; приводятся конкретные примеры их применения в селекции овощных и злаковых культур.

Ключевые слова: растения; пигментация; вторичные метаболиты; флавоноиды; каротиноиды; антиоксиданты; регуляторные гены; маркер-ориентированная селекция; Solanaceae; Poaceae.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?
Аджиева В.Ф., Бабак О.Г., Шоева О.Ю., Кильчевский А.В., Хлесткина Е.К. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):561-573. DOI 10.18699/VJ15.073

HOW TO CITE THIS ARTICLE?
Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Y., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. Molecular-genetic mechanisms underlying fruit and seed coloration in plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):561-573. DOI 10.18699/VJ15.073

Molecular-genetic mechanisms underlying fruit and seed coloration in plants

V.F. Adzhieva[1], O.G. Babak[1], O.Y. Shoeva[2], A.V. Kilchevsky[1], E.K. Khlestkina[2, 3]

[1] Institute of Genetics and Cytology NASB, Minsk, Belarus
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Diverse patterns of plant fruit and seed coloration are determined by the presence of two main types of pigment, carotenoids (red, orange and yellow color) and anthocyanins (purple, blue, red). They belong to two groups of secondary metabolites, isoprenoids and flavonoids. Interest towards the genetic mechanisms that control coloration in plants has recently increased due to the antioxidant and antimicrobial properties of some pigments and their colorless precursors consumed with plant-derived food. The genes encoding enzymes involved in step-by-step conversion of initial organic molecules to final pigmented compounds are referred to as structural genes, while regulatory genes are responsible for activation of the expression of structural genes and control the synthesis of pigments at certain times and in proper tissue. The data in plant genetics accumulated to date show that the inter- and intraspecies phenotypic diversity in coloration is mainly related with regulatory genes. Previously developed rich gene collections and precise genetic models for coloration traits in dicots and monocots as well as the rapid development of molecular genetic methods for studying plants allowed for studying genetic regulation of pigment synthesis at a molecular level. The peculiarities of the regulation of carotenoid biosynthesis are exemplified with Solanaceae fruits. The genetic mechanisms underlying the synthesis of various flavonoid pigments are exemplified with a study of seed color in Poaceae plants. In summary, prospects for the practical use of regulatory genes that control pigment synthesis are discussed and examples of their practical use in vegetable and cereal crop breeding are given.

Key words: plants; pigmentation; secondary metabolites; flavonoids; carotenoids; antioxidants; regulatory genes; marker-assisted selection; Solanaceae; Poaceae.

УДК 575.11:581.17:577.15
Поступила в редакцию 16.07.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: babak_olga@mail.ru

Наряду с хлорофиллом, придающим зеленую окраску, растения вырабатывают целый ряд других органических пигментов, создающих широкий спектр, от желтого до ярко-красного и иссиня-черного оттенков. Наиболее распространенные классы пигментных соединений – это относящиеся к изопреноидам каротиноиды (желтые, оранжевые и красные пигменты) и соединения фенольной природы, антоцианы (красные, синие и фиолетовые пигменты). Наряду с каротиноидами желтый или оранжевый оттенок различным частям растения могут придавать ауроны, флавоны, флавонолы, гликозиды флавонолов и антоцианидины, которые так же, как и антоцианы, относятся к фенольным соединениям – флавоноидам. Красновато-коричневая или темно-коричневая окраска семян растений обусловлена флавоноидными соединениями – проантоцианидинами и флобафенами. Характерная окраска корнеплода у свеклы связана с синтезом специфических пигментов – беталаинов. И, наконец, черная окраска семян некоторых растений (например подсолнечника) обусловлена недостаточно изученными на сегодняшний день меланин-подобными пигментами растений (Запрометов, 1974; Britton, 1983; Strack et al., 2003; Jana, Mukherjee, 2014).

Высокая степень изменчивости по окраске растений обусловлена разнообразием генетических механизмов, определяющих как тип накапливаемого пигмента, так и место его синтеза. Фенотипическое разнообразие по признакам окраски может быть проиллюстрировано на примере ячменя (рис. 1, *а*) и пшеницы (рис. 1, *б*). В том числе показано, как одна и та же группа пигментов (антоцианов) при синтезе в разных тканях под действием тканеспецифичных регуляторных механизмов приводит к формированию различных признаков окраски, например признаков «голубое зерно» и «фиолетовое зерно» у пшеницы (рис. 1, *б*).

Основная функция пигментов – фотопротекторная, направленная на защиту структур растительной клетки от разрушительного действия ультрафиолетового излучения. Немаловажной является и функция пигментов для подачи визуальных сигналов: окраска цветов служит для привлечения насекомых-опылителей, а окраска плодов – для привлечения животных-распространителей семян (Britton, 1983; Clegg, Durbin, 2000; Sasaki, Takahashi, 2002; Khlestkina, 2013).

Для человека изучение окраски у растений представляет интерес не только со стороны визуально-эстетической оценки, но и в силу влияния пигментных соединений на вкусовые качества употребляемых растительных продуктов. Но наибольшее и постоянно возрастающее в последнее время внимание к этой области исследований связано с антиоксидантными и антимикробными свойствами определенных пигментов и их бесцветных предшественников, употребляемых в составе растительной пищи. Эти соединения обеспечивают профилактику онкологических заболеваний, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, повышают иммунитет, улучшают синтез зрительных пигментов, активируют процессы обмена веществ и т. д. (Middleton et al., 2000; Johnson, 2002; Lila, 2004).

Большое разнообразие биохимического состава, окраски растений обеспечивается комплексом генов, кодирующих ферменты, необходимые для последовательных превращений исходных органических молекул в конечные пигментные соединения и их синтез в определенный момент времени в нужной части растения. Гены, кодирующие ферменты, принято относить к структурным. Другая основная группа генов – это регуляторные гены, активирующие экспрессию структурных генов. Накопленные к настоящему моменту данные свидетельствуют о том, что наблюдаемое на фенотипическом уровне межвидовое и внутривидовое разнообразие по признакам окраски связано именно с генами, кодирующими регуляторные факторы биосинтеза пигментных соединений. У регуляторных генов нередко возникают и быстро эволюционируют дуплицированные копии. Также для регуляторных генов характерны большое разнообразие и заметное варьирование частот встречаемости аллелей. При этом нередко происходит комбинирование различных аллелей разных генов в одном генотипе, что приводит к еще более широкому спектру проявлений на фенотипическом уровне у соответствующего вида. При сравнении разных видов однодольных и двудольных растений становится ясно, что в ходе эволюции достаточно быстро возникали тканеи видоспецифические особенности регуляции биосинтеза пигментных соединений. В отличие от регуляторных генов структурные гены можно отнести к консервативной части генной сети биосинтеза растительных пигментов (Khlestkina et al., 2008; Rausher, 2008; Khlestkina, 2010).

Особенности регуляции биосинтеза каротиноидов выявлены, в первую очередь, благодаря изучению накопления данных соединений в плодах пасленовых растений (сем. Solanaceae). Разнообразие генетических механизмов, обеспечивающих синтез различных флавоноидных пигментов, раскрылось при изучении окраски семян у злаковых растений (сем. Poaceae). В заключительном разделе обзора представлены некоторые примеры и перспектива использования регуляторных генов, контролирующих окраску, в селекционном процессе.

Генетическая регуляция накопления каротиноидов

Каротиноиды – большая и разнообразная группа желтых, оранжевых, красных пигментов, принадлежащих к изопреноидам тетратерпенам (DOXP/MEP или MVA путь) и имеющих полиизопреноидную (C40) цепь сопряженных двойных связей. Каротиноиды присутствуют в мембранах всех фотосинтезирующих организмов и выполняют ряд важнейших функций в процессе фотосинтеза: антенную (дополнительные пигменты в процессе поглощения солнечной энергии), защитную (тушители триплетного хлорофилла и синглетного кислорода; предохраняют реакционный центр от мощных потоков энергии при высоких интенсивностях света и стабилизируют липидный слой тилакоидных мембран, защищая его от переокисления) (Стржалка и др., 2003; Алехина и др., 2005).

Среди всех семейств растений Solanaceae является моделью для изучения эволюции синтеза вторичных метаболитов. Ранние исследования процесса биосинтеза каротиноидов принадлежат Porter и Lincoln, которые в 1950 г., основываясь на биохимическом анализе промежуточных продуктов, предложили схему последовательного синте-

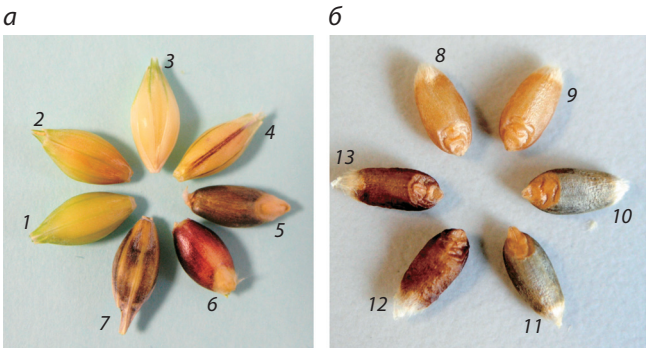


Рис. 1. Различные типы окраски зерновки у изогенных линий ячменя (*а*) и пшеницы (*б*) на основе сортов Bowman и Саратовская 29 соответственно.

1 – сорт Bowman; линии сорта Bowman: *2* – с оранжеватой окраской цветковой чешуи вследствие нарушения синтеза лигнина; *3* – с белым цветом чешуи и перикарпа вследствие нарушения синтеза хлорофилла; *4* – с красной жилкой цветковой чешуи, благодаря синтезу антоцианов; *5*, *6* – с серо-голубой и красной (пурпурной) окраской зерна за счет синтеза антоцианов в алейроновом слое и перикарпе соответственно; *7* – с черной окраской перикарпа и чешуи за счет неизученных пигментов (предположительно, меланин-подобных пигментов растений); *8*, *9* – сорт Саратовская 29, имеющий красновато-коричневый оттенок зерна за счет синтеза проантоцианидинов в семенной оболочке; *10*, *11* – линия с серо-голубой окраской зерна за счет синтеза антоцианов в алейроновом слое (признак «голубое зерно»); *12*, *13* – линия с пурпурной окраской зерна за счет синтеза антоцианов в перикарпе (признак «фиолетовое зерно»). (Семена ячменя любезно предоставил д-р А. Борнер, IPK-Gatersleben, Германия; семена пшеницы – из рабочей коллекции сектора функциональной генетики злаков ИЦиГ СО РАН; фото авторов.)

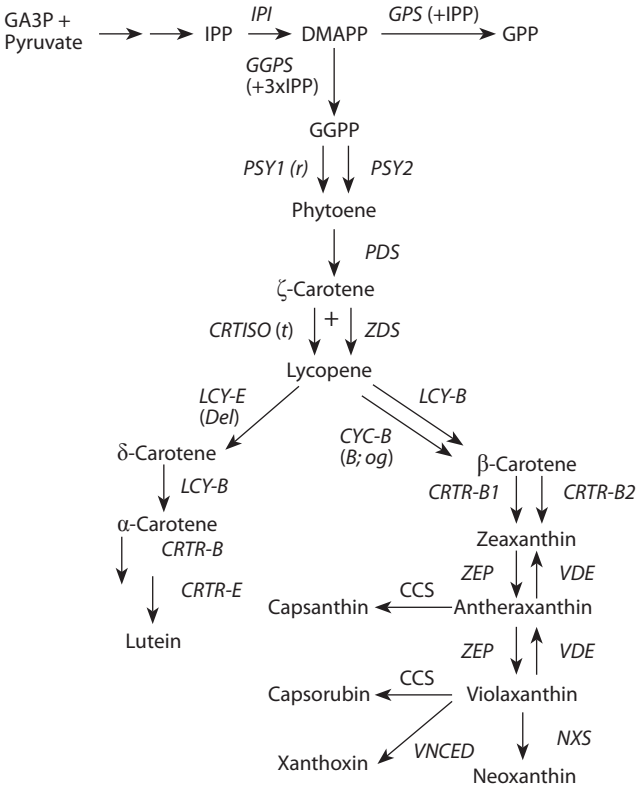


Рис. 2. МЕР-путь биосинтеза каротиноидов у томата (Hirschberg, 2001).

Ферменты и промежуточные вещества: CCS – капсантин-капсорубин-синтаза; CRTISO – каротиноидная изомераза; CRTR-B – гидроксилаза β-кольца; CRTR-E – гидроксилаза ε-кольца; CYC-B – хромопласт-специфическая ликопин-β-циклаза; DMAPP – диметилаллилдифосфат; GA3P – геранилальдегид-3-фосфат; GPP – геранилдифосфат; GGPP – геранилгеранилдифосфат; GGPS – геранилгеранилдифосфат синтаза; GPS – геранилдифосфатсинтаза; IPI – IPP-изомераза; IPP – изопентилдифосфат; LCY-B – ликопин-β-циклаза; LCY-E – ликопин-ε-циклаза; NXS – неоксантин-синтаза; PDS – фитоиндесатураза; PSY – фитоинсинтаза; VDE – виолаксантиндиэпоксидаза; VNCED – 9-*cis*-эпоксикаротиноиддиоксигеназа; ZDS – ζ-каротиндесатураза; ZEP – зеаксантинэпоксидаза. Мутации томата, изменяющие биосинтез каротиноидов, показаны в скобках: *B* – *Beta*; *Del* – *Delta*; *og* – *old-gold*; *r* – *yellow-flesh*; *t* – *tangerine*.

за каротиноидов, согласно которой одни каротиноиды используют в качестве промежуточных продуктов для образования других. В середине 1980-х г. был открыт немевалонатный путь (МЕР-путь) синтеза каротиноидов (Flesch, Rohmer, 1988), по которому изопреноиды синтезируются у эубактерий, в хлоропластах фотосинтезирующих тканей и хромопластах плодов и цветов (Ершов, 2005; Kopsell, Kopsell, 2006).

Начатые в 1990-х гг. молекулярные исследования по клонированию генов, принимающих участие в процессе биосинтеза каротиноидов, позволили определить ключевые этапы ферментативного превращения каротиноидов и их генетическую детерминацию. МЕР-путь биосинтеза каротиноидов и структурные гены, определяющие его этапы, представлены в работе J. Hirschberg (2001) (рис. 2).

Синтез каротиноидов, произведенных в пластидах, начинается с соединения двух молекул изопренилдифосфата (IPP) и образования диметилаллилдифосфата (DMAPP), который преобразуется в геранилгеранилдифосфат (GGPP), являющийся предшественником первого каротиноида биосинтетического пути – бесцветного фитоина. Фитоин (C_{40}) образуется в результате конденсации двух молекул GGPP (C_{20}) при участии фермента фитоинсинтазы (PSY). Ген *PSY1* играет ключевую роль на начальном этапе синтеза каротиноидов. Мутация *psy1* является причиной формирования дефектного фермента, низкого содержания каротиноидов, формирования желтой мякоти плодов (фенотип *r*). Известно еще о двух генах *PSY* у томата: *PSY2*, который работает исключительно в хлоропластсодержащих тканях, и *PSY3*, который, предположительно, функционирует в корнях в стрессовых условиях (Kachanovsky et al., 2012).

В результате дегидрирования ферменты PDS (фитоиндесатураза) и ZDS (ζ-каротиндесатураза) катализируют образование из фитоина через ζ-каротин и проликопин цветной молекулы ликопина. Мутация *t* (*tangerine*) гена, кодирующего каротиноидную изомеразу CRTISO, нарушает стадию превращения проликопина (тетрацисликопин) в ликопин (транс-формы) и ведет к повышенной концентрации проликонина и образованию плодов насыщенной желтой окраски. Каротиноиды участка «фитоин – ликопин» являются линейными молекулами. На следующем этапе биосинтеза происходит образование из ликопина каротиноидов с тремя типами бензольных колец: β-, γ- или ε-тип. Ликопинциклазы, катализирующие реакцию, являются специфичными, их образование детерминируется различными генами. Так, ликопин-β-циклаза (CYC-B) находится под контролем доминантного гена *B* (*Beta*),

ликопин-ε-циклаза (LCY-ε) – гена *Del* (*Delta*). Далее происходит образование ксантофиллов за счет ферментативного окисления α-каротина до лютеина и β-каротина до зеаксантина, виолоксантина или неоксантина (Hirschberg, 2001; Bramley, 2002; Liu et al., 2003).

Наряду с генами, определяющими этапы синтеза каротиноидов, важное влияние на их накопление оказывают регуляторные гены, детерминирующие механизмы транскрипционного (гены TF) и посттранскрипционного (гены PTGS) регулирования биосинтеза пигментов и их деградации. Большинство генов, кодирующих транскрипционные факторы, замедляют или полностью подавляют созревание плодов. К таким факторам относятся RIN-MADS (Vrebalov et al., 2002), CNR-SQUAMOSA (Manning, 2006), TAGL1-MADS BOX (Vrebalov et al., 2009), LeHB-1 HB zip (Lin et al., 2008) и SIAP2a (ген *AP2*) (Chung et al., 2010; Karlova et al., 2011) (таблица).

Известные регуляторные гены у Solanaceae оказывают как прямое, так и косвенное влияние на биосинтез каротиноидов. Среди них важнейший вклад в регуляцию биосинтеза вносят гены семейства MADS Box Transcription, такие как гены *AGAMOUS*. Они способны регулировать биосинтез каротиноидов посредством взаимодействия с промоторами генов ликопин-β-циклазы (CYC-B) и каротиноидной изомеразы (CRTISO). У томата описаны два представителя *AGAMOUS* (*TAG1* и *TAGL1*). *TAGL1* также регулирует пигментацию плодов томата в результате прямой активации гена биосинтеза этилена *ACS2* (Itkin, 2009). Известно, что еще один MADS-box, ген *TDR4*, действует совместно с вышеописанным *TAGL1*, регулируя созревание плодов томата (Nguyen et al., 2014).

К числу важнейших регуляторов созревания плодов относят локус *RIN*, принадлежащий к семейству генов, кодирующих транскрипционные факторы SEPALLATA MADS-box. Локус *RIN* содержит два тандемных MADS-box гена, один из которых, *LeMADS-RIN*, регулирует созревание, а другой, *LeMADS-MC*, отвечает за развитие чашелистиков и недетерминированность соцветий (Vrebalov et al., 2002). Регуляторная активность LeMADS-RIN проявляется в способности связываться с CArG-box элементами промоторов генов *ACS2* и *ACS4*, участвующих в созревании, и изменять их экспрессию (Fujisawa et al., 2011). Также показана способность RIN связываться с геном каротиногенеза *PSY1* (Pan et al., 2010).

Недавние исследования показали, что *RIN* участвует в синтезе этилена и передаче сигналов, модификации клеточной стенки, накоплении каротиноидов, формировании аромата и транскрипционном регулировании связанных с созреванием генов, кодирующих транскрипционные факторы, включая *NOR*, *CNR*, *TDR4* и *HB-1* (Fujisawa et al., 2011; Martel et al., 2011).

Ген *NOR* кодирует транскрипционный фактор LENAC-NOR. Мутация *nor*, вызванная короткой делецией (2 п. н.), приводит к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белка (Giovannoni, 2004). Последствия данной мутации и мутации *rin* схожи между собой. В работе S. Osorio (2011), в которой всесторонне, на уровне транскриптов, белковых продуктов и метаболитов, была охарактеризована роль моногенных мутаций *rin* и *nor* в регуляции биосинтеза этилена и созревания томата, показано, что аллели *rin* и *nor* действуют совместно в процессе, связанном с управлением созревания плодов, причем действие *nor* проявляется в более сильном подавлении созревания плодов, чем *rin*.

Еще одним транскрипционным фактором, снижающим накопление каротиноидов, является CNR (Squamosa Promoter Binding Protein) (Lin, 2008). Был выявлен редкий доминантный аллель гена *Cnr* томата, который приводит к несозревающему фенотипу с двумя отличительными особенностями: плотные плоды с уменьшенной клеточной адгезией (мучнистой структурой перикарпия) и полное отсутствие биосинтеза каротиноидов (Orfila et al., 2002). Для растений, несущих аллель *Cnr*, характерны снижение синтеза этилена, непигментированный перикарпий и повышенная плотность плодов. В отличие от мутаций в других генах (*Nr*, *nor* и *rin*), влияющих на созревание через частичное подавление синтеза ликопина, мутация гена *Cnr* связана с полным подавлением экспресии гена *PSY1* и биосинтеза каротиноидов даже в присутствии этилена (Manning, 2006).

Ген транскрипционного фактора *LeHB-1* кодирует белок HD-Zip класса (таблица) (Lin et al., 2008). *LeHB-1* способен взаимодействовать с промотором гена биосинтеза этилена *ACO1*, усиливая его экспрессию и процесс созревания плодов томата.

Ген томата *SlAp2a*, замедляющий созревание и накопление каротиноидов, описан в семействе регуляторных факторов AP2/ERF (Chung et al., 2010). *SlAp2a* вовлечен в регулирование этиленового и ауксинового сигнального пути, в процесс дифференцировки хлоропластов. В плодах томата дикого типа *SlAp2a* подавляет образование этилена. Еще одним геном, кодирующим транскрипционный фактор семейства AP2/ERF, является *ERF6*, он регулирует накопление каротиноидов. У томата *SlERF6* контролирует накопление транс-ликопина и β-каротина. Предполагают, что регуляторы этиленового синтеза и созревания плодов *SlERF6* и *SlAP2a* действуют совместно, осуществляя негативный контроль этиленовых сигналов во время созревания (Lee et al., 2012).

Регулирующее влияние на накопление каротиноидов оказывают гены, связанные с работой фоторецепторов. Гены *HP-1* и *HP-2* у Solanaceae являются ключевым регулятором цитокининового контроля клеточного цикла, размера клеток и числа хлоропластов (Caspi et al., 2008). Данные гены отнесены к семье UV-damaged DNA-binding protein (таблица). Действие мутантов серии *high pigment* (*hp-1*, $hp\text{-}1^{w}$, *hp-2*, $hp\text{-}2^{j}$ и $hp\text{-}2^{dg}$) характеризуется увеличением числа и размеров хлоропластов, что служит основой для усиления синтеза каротиноидов в плодах томата при созревании (Kolotilin et al., 2007; Barry, 2009). Растения томата, несущие в своем генотипе одну из таких мутаций, имеют высокий уровень антоцианов и хлорофилла в сеянцах, короткий гипокотиль и интенсивную пигментацию листьев и плодов. Темно-красные плоды мутантов отличаются высоким уровнем каротиноидов, прежде всего ликопина, витаминов С и Е, сахаров и некоторых флавоноидов (Palmieri et al., 1978; Kolotilin et al., 2007).

Другие гены светозависимых транскрипционных факторов, *LeHY5* и *LeCOP1LIKE*, принадлежащие к семейству bZIP, являются положительным и отрицательным регу-

Регуляторные гены биосинтеза флавоноидов и каротиноидов у представителей одно- и двудольных растений

Соединения	Семейство регуляторных факторов	Гены у представителей растений	
		однодольных	двудольных
Флавоноиды	MYB	***Hordeum vulgare*L.** *HvMpc1* (Shoeva et al., 2015); ***Oryza sativa* L.** *C* (Reddy et al., 1998; Saitoh et al., 2004); ***Triticum aestivum* L.** *Mpc1* (Li et al., 1999); ***Zea mays* L.** *C1*, *Pl1*, *P1* (Paz-Ares et al., 1987; Chandler et al., 1989; Goff et al., 1990; Petroni et al., 2000)	***Arabidopsis thaliana* L. Heinh.** *TT2*, *CPC*, *MYBL2* (Borevitz et al., 2000; Gonzalez et al., 2008; Dubos et al., 2008; Matsui et al., 2008); ***Petunia hybrida* L.** *AN2*, *AN4* (Quattrocchio et al., 1999, 2006); ***Vitis vinifera* L. Heinh.** *MYBA1*, *MYBA2*, *MYB5a* (Kobayashi et al., 2002; Deluc et al., 2006, 2008; Walker et al., 2007; Cutanda-Perez et al., 2009)
	bHLH	***Hordeum vulgare* L.** *Ant2* (Cockram et al., 2010); ***Oryza sativa* L.** *Pl* (Hu et al., 1996, 2000; Sakamoto et al., 2001); ***Triticum aestivum* L.** *TaMyc1* (Shoeva *et al*., 2014); ***Zea mays* L.** *B*, *R*, *Lc*, *Sn*, *In1* (Burr et al., 1996; Chandler et al., 1989; Goff et al., 1990; Consonni et al., 1993; Petroni et al., 2000)	***Arabidopsis thaliana* L. Heinh.** *TT8* (Nesi et al., 2000); *GL3/EGL3* (Bernhardt et al., 2003; Heim et al., 2003; Zhang et al., 2003); ***Ipomoea tricolor* Cav.** *ItIVS* (Park, 2012); ***Petunia hybrida* L.** *AN1*, *JAF13* (Llyod et al., 1992; Quattrocchio et al., 1998; Spelt et al., 2000); ***Vitis vinifera* L. Heinh.** *MYC1*, *MYCA1* (Hichri et al., 2010; Matus et al., 2010)
	WD40	***Zea mays* L.** *PAC1* (Selinger, Chandler, 1999)	***Arabidopsis thaliana* L. Heinh.** *TTG1* (Walker et al., 1999); ***Petunia hybrida* L.** *AN11* (de Vetten et al., 1997); ***Vitis vinifera* L. Heinh.** *WDR1*, *WDR2* (Matus et al., 2010)
Каротиноиды	ULT	Нет данных	***Crocus sativus L.*** *CsULT1* (Ashraf et al., 2015);
	bHLH; bHLH/LZ		***Arabidopsis thaliana* L. Heinh.** *PIF1* (Toledo-Ortiz et al., 2010). ***Solanum lycopersicum* L.** *SlbHLH006*, *SlbHLH078*, *SlbHLH095* (Sun et al., 2015); ***Brassica rapa ssp. pekinensis*** *BrBIM1* (Jung et al., 2014)
	Zinc-coordinating DNA-binding domains		***Brassica rapa ssp. pekinensis*** *BrA20/AN1-like*, *BrZFP8* (Jung et al., 2014)
	GCC type transcriptional factor		***Citrus clementina*** *CcGCC1* (Ríos et al., 2010)
	AP2/ERF transcription factor)		***Solanum lycopersicum* L.** *SlERF6* (Lee et al., 2012); ***Arabidopsis thaliana* L. Heinh** *RAP2.2* (Welsch et al., 2007), ***Solanum lycopersicum* L.** *SlAP2a* (Chung et al., 2010; Karlova et al., 2011)
	MADS Box Transcription Factor		***Solanum lycopersicum* L.** *RIN-MADS* (Vrebalov et al., 2002), *TAGL1* (Vrebalov et al., 2009); ***Arabidopsis thaliana* L. Heinh.** *TDR4* (Manning et al., 2006); *SHP1/2* (Ferrandiz et al., 1999, 2000), ***Prunus persica* L.** *PpPLENA* (Tadiello et al., 2009)
	SBP-box (SQUAMOSA promoter binding protein-like)		***Solanum lycopersicum* L.** *CNR* (Manning et al., 2006)
	MYB	***Zea mays* L.** *Golden2* (Fitter et al., 2002) ***Oryza sativa* L.** *OsGLK1* (Nakamura et al., 2009)	***Solanum lycopersicum* L.** *Sl-GLK2* (Powell et al., 2012), ***Arabidopsis thaliana* L. Heinh** *GLK* (Rossini et al., 2001)
	bZIP	Нет данных	***Solanum lycopersicum* L.** *HY5*, *COP1LIKE* (Liu et al., 2004)
	HB-ZIP		***Solanum lycopersicum* L.** *LeHB-1* (Lin et al., 2008)
	CRY		***Solanum lycopersicum* L.** *cry2* (Giliberto et al., 2005)
	UV-damaged DNA-binding protein		***Solanum lycopersicum* L.** *hp-1* и *hp-2* (Liu et al., 2004)
	STAY-GREEN	***Oryza sativa* L.** *nyc1* (Cha et al., 2002); *ccr1* (Park et al., 2002)	***Solanum lycopersicum* L.** *gf* (Kerr, 1956), ***Capsicum annum cl*** (Akhtar et al., 1999)
	SET DOMAIN GROUP 8	Нет данных	***Arabidopsis thaliana* L. Heinh.** *SDG8* (Cazzonelli, Pogson, 2010)

ляторами пигментации растений соответственно. Подавление экспрессии *LeHYS* ведет к сбою фотоморфогенеза томата на ранних этапах развития, нарушению структуры тилакоидов и снижению накопления каротиноидов. Репрессия *LeCOP1LIKE*, напротив, ведет к усиленному фотоморфогенезу, формированию темно-зеленых листьев и увеличению накопления каротиноидов на 25–43 % (Liu et al., 2004).

Ген *CRY2*, представитель другой семьи CRY (Cryptochrome), является также фоторецептором. Повышенная экспрессия *Cry2* приводит к увеличенному накоплению в трансгенных растениях томата флавоноидов и ликопина, что является результатом транскрипционного контроля и подавления экспрессии гена *lycopene-β-cyclase* (Giliberto et al., 2005). Фенотип таких растений подобен растениям с аллелями *hp1* и *hp2*, для которых также характерны уменьшенный гипокотиль и междоузлия, ярко пигментированные плоды с повышенным уровнем ликопина и флавоноидов. Однако растения с усиленной экспрессией гена *Cry2* имеют некоторые отрицательные качества – позднее цветение, наблюдаемое в условиях длинного и короткого дня, и повышенное формирование боковых побегов.

Накопление каротиноидов и окраска плодов у Solanaceae также регулируется геном *green-flesh* (*Gf*). Локус *Gf* кодирует регуляторный фактор STAY-GREEN (Barry et al., 2008). Мутанты *gf* не способны разрушать хлорофилл в начале созревания, но накапливают каротиноиды, что приводит к коричневой окраске зрелых плодов. Мутации, нарушающие деградацию хлорофилла, идентифицированы у некоторых высших растений: указанная выше мутация *gf* у томата, *cl* (*chlorophyll retainer*) у перца, *nyc1* (*non-yellow coloring 1*) у риса (Akhtar et al., 1999; Park et al., 2007).

Необходимо отметить, что регуляция накопления каротиноидов очень сложна и до конца не изучена, в настоящее время является объектом исследования многих научных центров.

Регуляторные гены синтеза флавоноидных пигментов

Флавоноиды – это группа природных биологически активных соединений, производных бензо-γ-пирона, в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из C_6-C_3-C_6 – углеродных единиц. C_3-фрагмент, связующий бензольные кольца, может быть представлен несколькими состояниями с различной степенью окисления. Каждое из этих состояний соответствует отдельному классу флавоноидов. Огромное разнообразие флавоноидных соединений достигается с помощью согласованного действия свыше 20 ферментов, которые, действуя поочередно, синтезируют сначала халконы, а затем дают начало различным классам и различным представителям внутри каждого класса (Хлесткина и др., 2014). Большинство классов – это пигментные соединения или предшественники других флавоноидных пигментов. Например, флавоны, гликозиды флавонолов и ауроны отличаются желтой и/или оранжевой окраской, флобафены (производные флаван-4-олов) и проантоцианидины (производные катехинов и лейкоантоцианидинов) придают тканям растений красновато-коричневый оттенок. Антоцианидины и их производные – антоцианы – обеспечивают широкую гамму пигментов, от розового до фиолетового (Britton, 1983; Winkel-Shirley, 2001). Флавоноидные соединения (прежде всего антоцианы) обладают фотопротекторным действием, кроме того, многие флавоноидные соединения способны противодействовать окислительному стрессу, возникающему вследствие воздействия неблагоприятных условий окружающей среды, или предупреждать его развитие, защищая, тем самым, различные клеточные структуры от разрушения. Некоторые флавоноиды обладают антимикробными свойствами (Khlestkina, 2013).

Представление о пути биосинтеза флавоноидных соединений и его регуляции сложилось, в первую очередь, за счет изучения злаковых растений, а именно кукурузы (*Zea mays* L.), которая с середины 20-го века, с момента открытия у нее мобильных элементов Б. МакКлинток (McClintock, 1956), стала на долгие годы основной моделью для многих направлений генетики растений.

В регуляции биосинтеза флавоноидов принимают участие три основные группы регуляторных факторов: MYB, MYC (bHLH) и WD40, образующие так называемый комплекс MBW, необходимый для активации структурных генов. Именно у кукурузы были впервые описаны гены, кодирующие два из этих трех факторов. В 1987 г. были открыты MYB-подобные факторы транскрипции R2R3 типа, регулирующие биосинтез флавоноидных пигментов антоцианов (Paz-Ares et al., 1987). В MBW-комплексе белки R2R3-MYB ответственны за светозависимую регуляцию биосинтеза (Taylor, Briggs, 1990). У кукурузы факторы R2R3-MYB кодируются генами *C1* (*Colorless 1*), *P1* (*Purple 1*) и *Pl1* (*Purple leaf 1*) (Paz-Ares et al., 1987; Goff et al., 1990; Petroni et al., 2000). Гомологичные гены, выделенные позже из других видов однодольных и двудольных растений, представлены в таблице.

MYC-подобные факторы, содержащие в своей структуре домен bHLH (основной спираль-петля-спираль домен), ответственны в MBW-комплексе за определение тканеспецифичности биосинтеза антоцианов (Taylor, Briggs, 1990). Первые гены, кодирующие MYC-подобные факторы B/R типа (по названию соответствующих локусов – *B* и *R*), были открыты также у кукурузы (Chandler et al., 1989). Позже на основании гомологии были выделены другие члены данного семейства из генома кукурузы и других растений (таблица). Фактор WD40 необходим для стабилизации комплекса MBW, первый представитель данной группы у растений, *An11*, был описан у петунии (de Vetten et al., 1997), его гомолог из генома кукурузы, *PAC1* (Selinger, Chandler, 1999) и других видов растений был выделен позднее (таблица).

В отличие от кукурузы, у которой структурные гены биосинтеза антоцианов совместно регулируются с помощью комплекса MBW (рис. 3), у *Arabidopsis thaliana* гены подразделяются на «ранние» и «поздние» гены биосинтеза. «Ранние» экспрессируются в отсутствие синтеза пигментов, благодаря активации с помощью определенного MYB-фактора, а «поздние» – так же, как гены кукурузы, при участии комплекса MBW (рис. 3). Предположения о том, что эти особенности отражают характерные отличия однодольных от двудольных, не оправдались, когда выяснилось, что и среди более мелких

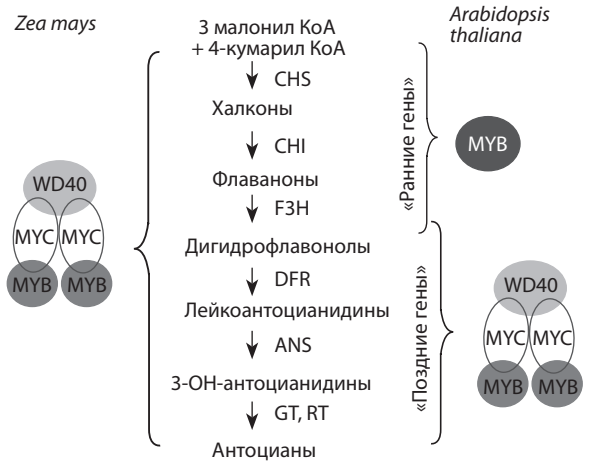


Рис. 3. Биосинтез антоцианов и проантоцианидинов и его регуляция у представителей однодольных (*Zea mays*) и двудольных (*Arabidopsis thaliana*) растений.

Ферменты: ANS– антоцианидинсинтаза; CHI – халконфлаванонизомераза; CHS – халконсинтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; F3H – флаванон-3-гидроксилаза; GT – гликозилтрансфераза; RT – рамнозилтрансфераза. Транскрипционные факторы: MYB, MYC, WD40. Модифицировано по: Petroni, Tonelli (2011).

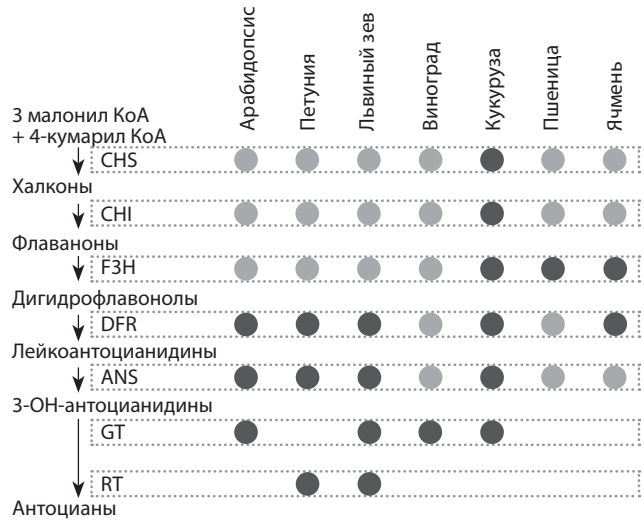


Рис. 4. Активность структурных генов биосинтеза антоцианов в окрашенных (темные круги) или неокрашенных (светлые круги) антоцианами тканях у представителей двудольных и однодольных.

ANS – антоцианидинсинтаза; CHI – халконфлаванонизомераза; CHS – халконсинтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; F3H – флаванон-3-гидроксилаза; GT – гликозилтрансфераза; RT – рамнозилтрансфераза. Суммировано по: Dooner, 1983; Cone et al., 1986; Ludwig et al., 1989; Martin et al., 1991; Quattrocchio et al., 1993; Boss et al., 1996; Pelletier, Shirley, 1996; Gonzalez et al., 2008; Khlestkina et al., 2008; Petroni, Tonelli, 2011; Tereshchenko et al., 2013; Shoeva et al., 2015.

таксонов есть свои специфические особенности. На рис. 4 схематически обозначена активность структурных генов у разных видов растений, в зависимости от того, связана она с наличием антоцианового пигмента или нет. У разных видов растений коэкспрессируются (совместно регулируются) разные группы генов, нет четкого деления на «ранние» или «поздние» гены, иногда особо регулируются отдельные гены в пути биосинтеза, например *F3h* у пшеницы (рис. 4).

Помимо видоспецифичных особенностей регуляции биосинтеза антоцианов, существуют особенности регуляции синтеза одних и тех же пигментов в различных тканях у одного и того же вида растений. Например, из всех признаков антоциановой окраски только окраска перикарпа конторолируется двумя комплементарными доминантными генами, кодирующими MYC- и MYB-подобный фактор, тогда как в регуляции окраски других частей растения выявлено участие лишь тех генов, которые локализуются в седьмой гомеологической группе хромосом и соответствуют MYB-фактору (рис. 5). Согласно концепции об участии комплекса MBW в активации структурных генов биосинтеза антоцианов, трудно предположить, что такой комплекс задействован лишь в синтезе пигментов в перикарпе, а в остальных тканях достаточно MYB-фактора. Наиболее вероятным объяснением является возможное варьирование аллельного разнообразия среди разных MYC- и MYB-кодирующих локусов. Действительно, изучение MYC-кодирующего гена *Pp3* (Shoeva et al., 2014) показало, что у него есть копии в хромосомах 2B и 2D мягкой пшеницы, не экспрессирующиеся в перикарпе, но активные в других частях растения, причем независимо от наличия/отсутствия окраски (рис. 6). Продукты генов *Myc3* и *Myc4* – потенциальные кандидаты, участвующие в формировании регуляторного комплекса MBW в колеоптиле, стебле и других частях растения. Тот факт, что локусы в хромосомах 2B и 2D никогда не выявлялись в ходе анализа сегрегирующих популяций, может свидетельствовать о том, что нефункциональные аллели генов *Myc3* и *Myc4* или редки, или не существуют, тогда как для *Myc1* (*Pp3*) имеется аллельное разнообразие, наблюдаемое на фенотипическом уровне и потому зафиксированное при анализе сегрегирующих популяций (Dobrovolskaya et al., 2006; Khlestkina et al., 2010).

Выявление особенностей регуляции синтеза пигментов стало возможным благодаря не только бурному развитию молекулярно-генетических методов исследования растений, но и созданию в предшествующие годы точных генетических моделей по признакам окраски. К наиболее подходящим моделям для исследования функций генов относятся также изогенные линии (Khlestkina, 2014). С помощью изогенных линий пшеницы, созданных в ИЦиГ СО РАН Ковалем В.С., было установлено, что фактор, принадлежащий семейству MYB, участвует в регуляции биосинтеза проантоцианидинов в семенной оболочке пшеницы и кодируется генами *R-A1*, *R-B1* и *R-D1*, локализованными в хромосомах 3A, 3B и 3D (Himi et al., 2005; Himi, Noda, 2005). Также при использовании набора изогенных линий пшеницы с различными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp* (ядром коллекции стали две исходные линии, полученные В.С. Арбузовой в ИЦиГ СО РАН) было установлено регуляторное взаимодействие между MYB-и MYC-кодирующими регуляторными генами (Shoeva et al., 2014; Gordeeva et al., 2015).

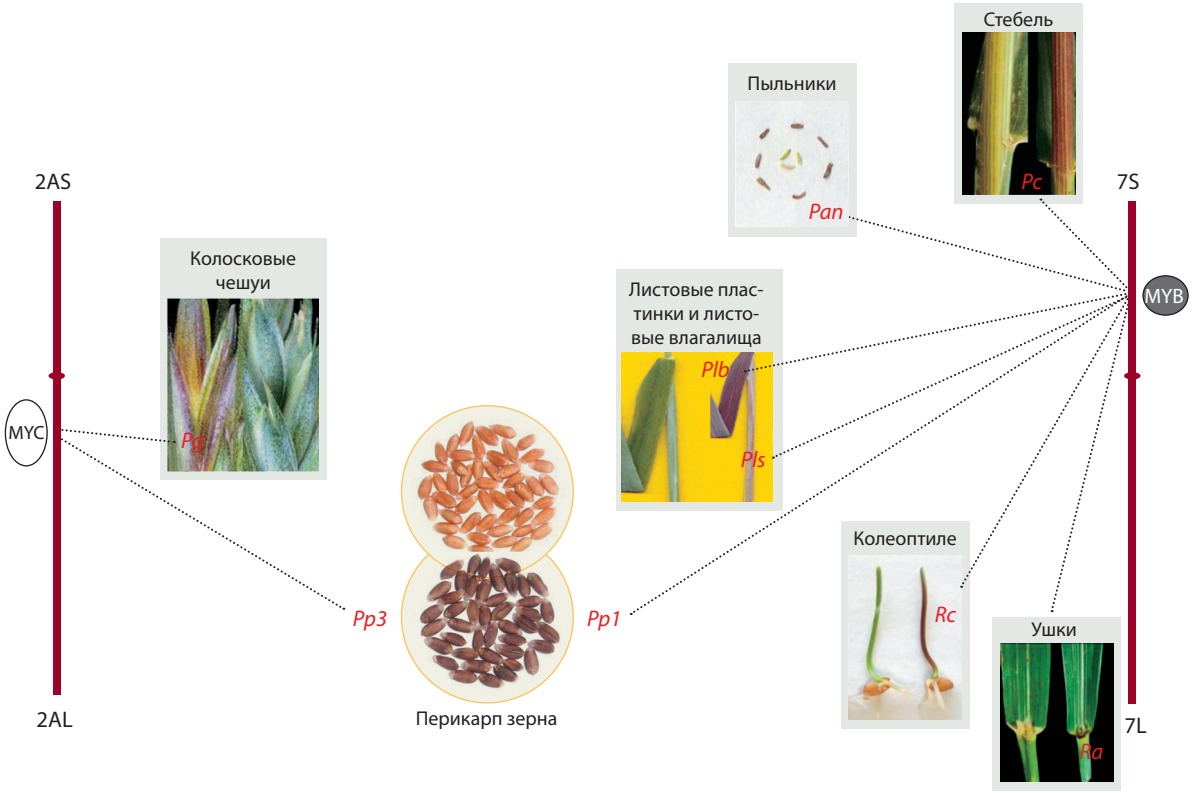


Рис. 5. Хромосомная локализация генов пшеницы, детерминирующих антоциановую окраску и кодирующих регуляторные факторы MYC- и MYB-типа.

Pan – purple anthers, Pc – purple culm, Pg – purple glume, Plb – purple leaf blade, Pls – purple leaf sheath, Pp – purple pericarp, Ra – red auricle, Rc – red coleoptile.
Суммировано по: Khlestkina et al., 2002, 2009, 2010, 2014; Shoeva et al., 2014; Himi, Taketa, 2015.

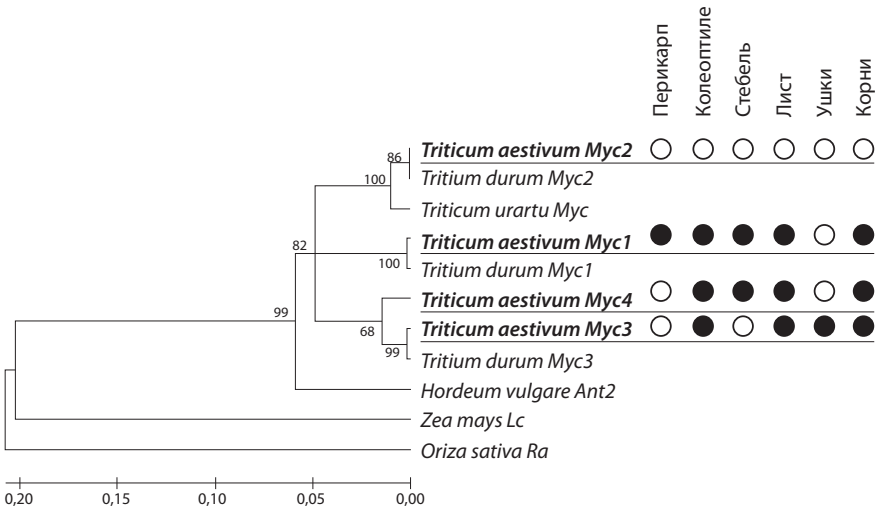


Рис. 6. Сходство MYC-факторов у разных видов злаков (Shoeva et al., 2014) и транскрипционная активность копий гена *Myc* пшеницы в различных частях растения пшеницы (● – ген экспрессируется; ○ – не экспрессируется).

Гены синтеза пигментов в селекции растений

На основании известных последовательностей ДНК, а также выполненных работ по секвенированию изучаемых аллелей, влияющих на накопление каротиноидов в плодах томата, разработаны рекомендации по ДНК-типированию аллелей регуляторных факторов, удлиняющих период сохранности плодов *rin* (*ripening-inhibitor*), *nor* (*nonripening*), nor^A (*alcobaca*); аллелей структурных генов: *PSY1* (*r*) (кодирует фитоинсинтазу, PSY1), *t* – *tangerine* (кодирует каротиноидную изомеразу, CRTISO), *B* – *Beta* (ликопин-β-циклаза, CYCB), *Del* – *Delta* (ликопин-ε-циклаза, LCY-ε), *og* (*old-gold*) и og^c (*old-gold crimson*); аллелей генов, косвенно регулирующих накопление каротиноидов *hp-1* и $hp\text{-}2^{dg}$ (*hp – high pigment*), способствующих увеличению количества и размера пластид, а также генов *gf-3* и *gf-5* (*gf – green flesh*), модифицирующих процесс разрушения хлорофилла (Кильчевский и др., 2014). Данные методические рекомендации использованы в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси для создания форм томата с высоким качеством плодов на этапе подбора форм для скрещивания, а также отбора селекционного материала в поколениях F_2 с желаемой комбинацией генов.

Большой практический интерес в селекции на качество плодов томата представляет комбинирование генов, удлиняющих период сохранности плодов томата, с генами, контролирующими содержание каротиноидов, что позволит создать формы с повышенным содержанием ликопина, каротина и одновременным

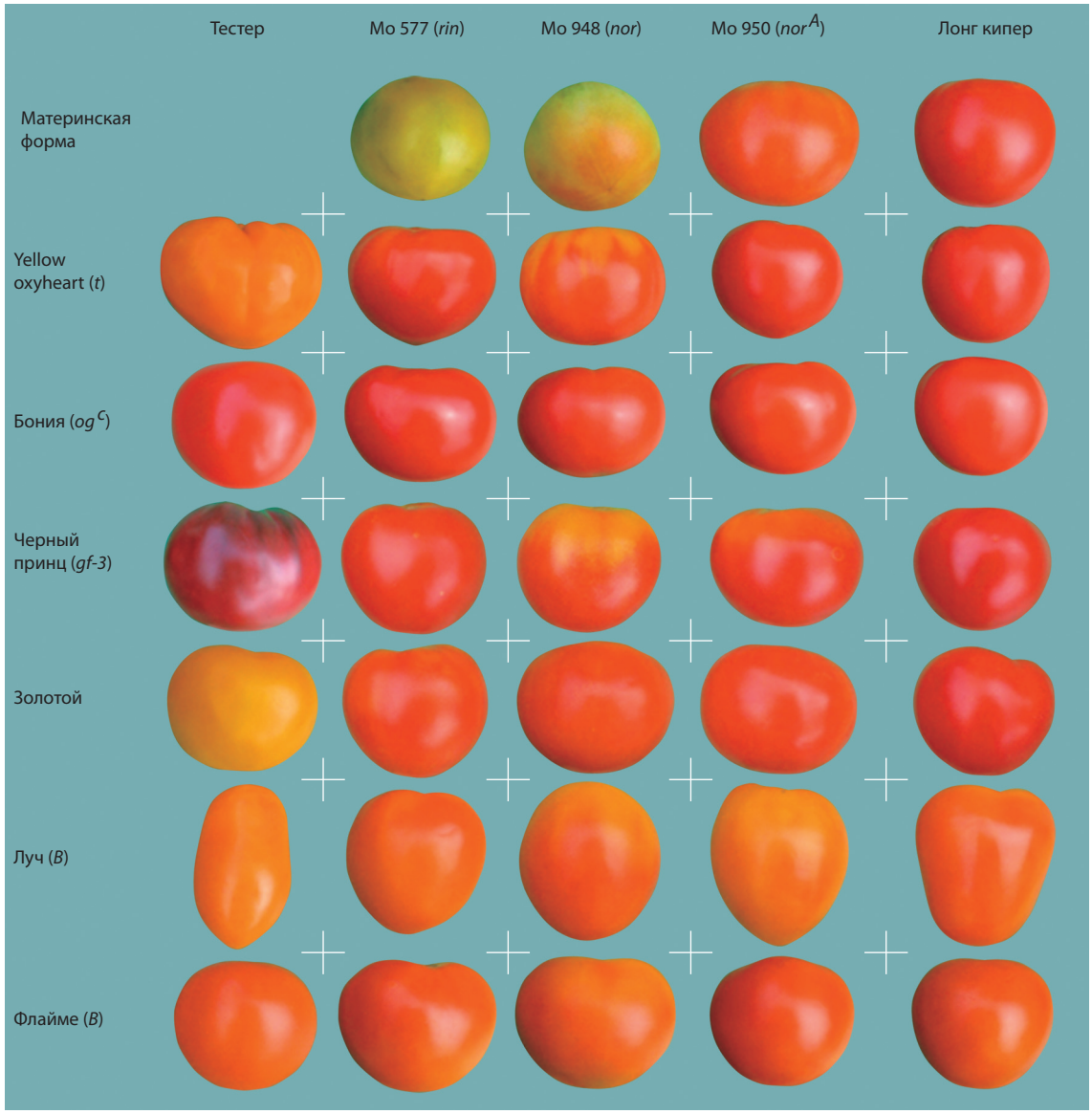


Рис. 7. Схема создания гибридов томата, сочетающих гены длительного периода сохранности плодов (*rin*, *nor* и *nor*^{A}) и повышенного содержания каротиноидов (*B*, *og*^{c}, *t*, *gf-3*) (Кильчевский и др., 2014).

Рис. 8. Гибриды томата F_1 с комбинациями аллелей: *а* – *B*/*rin*, *B*/*rin*/*gf*, *B*/*rin*/*hp*; *б* – *og*^{c}/*nor*, *og*^{c}/*nor*/*gf*, *og*^{c}/*nor*/*hp* (Кильчевский и др., 2014).

длительным периодом хранения плодов. Применение эффективных молекулярно-генетических приемов в сочетании с традиционными методами селекции томата будет способствовать повышению эффективности селекционного процесса. На основании молекулярно-генетического анализа изучаемой коллекции были созданы гибриды F_1 с генами, участвующими в процессе биосинтеза и превращения каротиноидов, и генами, контролирующими созревание плодов (рис. 7).

На следующем этапе работы были отобраны гомозиготные формы с различным сочетанием структурных и регуляторных генов. Для дальнейшего селекционного улучшения генотипа полученные гомозиготные растения были вовлечены в гибридизацию с образцами, несущими аллели *hp-2*^{dg} и *gf-3* (рис. 8). Затем были выполнены отборы гомозиготных по трем парам аллелей форм в поколении F_2.

Созданный материал был оценен по признакам накопления каротиноидов, длительности периода хранения и продуктивности, отобраны ценные формы для селекции на качество плодов. Подробное описание выполненной работы представлено в четвертом томе коллективной монографии Института генетики и цитологии НАН Беларуси (Кильчевский и др., 2014).

У злаков перспективным направлением является использование регуляторных генов биосинтеза каротиноидов для получения зерна, богатого витамином А (Al-Babili, Beyer, 2005), а также применение ряда регуляторных генов, контролирующих синтез флавоноидных пигментов в различных частях зерновки. Например, синтез проантоцианидинов в семенной оболочке связан с устойчивостью к прорастанию пшеницы на корню (Freed et al., 1976), а наличие антоцианов в перикарпе может способствовать лучшей сохранности семян после длительного хранения (Гордеева, Хлесткина, 2013). Кроме того, зерно, содержащее антоцианы в алейроновом слое или перикарпе (рис. 1), может использоваться для изготовления отрубей и цельнозерновых продуктов с повышенным содержанием антиоксидантов. Несмотря на то что пигментация тех или иных органов сама по себе может служить отличным маркером при селекции по другим признакам, для направленной передачи генов, контролирующих окраску, также целесообразно использовать маркеры. Например, при отборе пшеницы с помощью ДНК-маркеров по признаку антоциановой окраски перикарпа время получения конечного генотипа может быть сокращено вдвое, а количество занимаемых под селекционый материал – в десятки раз (Gordeeva et al., 2015).

Таким образом, своевременное создание генетических коллекций по признакам окраски у двудольных и однодольных растений в сочетании с развитием молекулярно-генетических методов исследования растений позволило выявить особенности генетической регуляции синтеза флавоноидов и каротиноидов растений и охарактеризовать на молекулярном уровне ключевые гены, участвующие в биосинтезе данных соединений. Характеристики выделенных генов позволят контролировать на молекулярном уровне и ускорять процесс отбора по признакам окраски, важным для повышения питательной ценности продуктов, производимых из плодов и семян растений.

Благодарности

Статья подготовлена при поддержке программы совместных проектов Фонда фундаментальных исследований Национальной академии наук Беларуси (Б 15 СО-051) и Сибирского отделения РАН на 2015–2017 гг. (проект № 22), а также при частичной поддержке Государственной бюджетной программы Российской Федерации VI.53.1.5 и Межгосударственной целевой программы ЕВРАЗЭС «Инновационные биотехнологии» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь» на 2011–2015 гг. (задание 3.11).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. Каротиноиды. Физиология растений. Под ред. И.П. Ермакова. М.: Академия, 2005.

Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Взаимосвязь между накоплением антоцианов в перикарпе зерна пшеницы и реакцией на искусственное старение семян. Матер. науч.-практ. конф. «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине». 1–4 октября 2013 г. Новосибирск.

Ершов Ю.В. Метилэритритолфосфатный (немевалонатный) путь биосинтеза каротиноидов. Усп. биол. химии. 2005;45:307-354.

Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Выс. шк., 1974.

Кильчевский А.В., Бабак О.Г., Аджиева В.Ф., Некрашевич Н.А., Малышев С.В., Грушецкая З.Ф., Мишин Л.А., Добродькин М.М., Зайцева И.Е., Пугачева И.Г. Молекулярные технологии в селекции томата (*Solanum lycopersicum* L.). Генетические основы селекции растений. Т. 4. Минск, 2014.

Стржалка К., Кострецка-Гугала А., Латовски Д. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами. Физиол. растений. 2003;50(2):188-193.

Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю., Гордеева Е.И. Гены биосинтеза флавоноидов пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4/1):784-796.

Akhtar M.S., Goldschmidt E.E., John I., Rodoni S., Matile P., Grierson D. Altered patterns of senescence and ripening in *gf*, a stay-green mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). J. Exp. Bot. 1999;50(336):1115-1122.

Al-Babili S., Beyer P. Golden rice – five years on the road – five years to go? Trends in Plant Sci. 2005;10:565-573.

Ashraf N., Jain D., Vishwakarma R.A. Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 fromCrocus: a novel regulator of apocarotenoid biosynthesis. BMC Plant Biology. 2015;15(25):1-12.

Barry C., McQuinn R., Chung M., Besuden A., Giovannoni J.J. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. Plant Physiol. 2008;147:179-187.

Barry C.S. The stay-green revolution: Recent progress in deciphering the mechanisms of chlorophyll degradation in higher plants. Plant Sci. 2009;176:325-333.

Bernhardt C., Lee M.M., Gonzalez A., Zhang F., Lloyd A., Schiefelbein J. The bHLH genes GLABRA3 (GL3) and ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) specify epidermal cell fate in the Arabidopsis root. Development. 2003;130:6431-6439.

Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. Activation tagging identified a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell. 2000;12:2383-2393.

Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. Expression of anthocyanin biosynthesis genes in red and white grapes. Plant Mol. Biol. 1996;32: 565-569.

Bramley P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. J. Exp. Bot. 2002;53(377):2107-2113.

Britton G. The Biochemistry of Natural Pigments. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983.

Burr F.A., Burr B., Scheffler B.E., Blewitt M., Wienand U., Matz E.C. The maize repressor-like gene intensifierl shares homology with the rVb7 multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. Plant Cell. 1996;8:1249-1259.

Caspi N., Levin I., Chamovitz D.A., Reuveni M. A mutation in the tomato *DDB1* gene affects cell and chloroplast compartment size and CDT1 transcript. Plant Signal Behavior. 2008;3(9):641-649.

Cazzonelli C.I., Pogson B.J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Trends Plant Sci. 2010;15(5):266-274.

Cha K.W., Lee Y.J., Koh H.J., Lee B.M., Nam Y.M., Paek N.C. Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice. Theor. Appl. Genet. 2002;104:526-532.

Chandler V.L., Radicella J.P., Robbins T.P., Chen J., Turks D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. Plant Cell. 1989;1: 1175-1183.

Chung M.Y., Vrebalov J., Alba R., Lee J., McQuinn R., Chung J.D., Klein P., Giovannoni J. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene (SIAP2a), is a negative regulator of fruit ripening. Plant J. 2010;64:936-947.

Clegg M.T., Durbin M.L. Flower color variation: A model for the experimental study of evolution. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000;97: 7016-7023.

Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smith D., Comadran J., Macaulay M., Luo Z., Kearsey M.J., Werner P., Harrap D., Tapsell C., Liu H., Hedley P.E., Stein N., Schulte D., Steuernagel B., Marshall D.F., Thomas W.T.B., Ramsay L., Mackay I., Balding D.J., The AGOUEB Consortium, Waugh R., O'Sullivan D.M. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010;107(50):21611-21616.

Cone K.C., Burr F.A., Burr B. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986;83: 9631-9635.

Consonni G., Geuna F., Gavazzi G., Tonelli C. Molecular homology among members of the R gene family in maize. Plant J. 1993;3: 335-346.

Cutanda-Perez M.C., Ageorges A., Gomez C., Vialet S., Terrier N., Romieu C., Torregrosa L. Ectopic expression of VlmybA1 in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. Plant Mol. Biol. 2009;69:643-648.

de Vetten N., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. Gene Dev. 1997;11:1422-1434.

Deluc L., Barrieu F., Marchive C., Lauvergeat V., Decendit A., Richard T., Carde J.P., Mérillon J.M., Hamdi S. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. Plant Physiol. 2006;140:499-511.

Deluc L., Bogs J., Walker A.R., Ferrier T., Decendit A., Mérillon J.M., Robinson S.P., Barrieu F. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. Plant Physiol. 2008;147: 2041-2053.

Dobrovolskaya O.B., Arbuzova V.S., Lohwasser U., Röder M.S., Börner A. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica. 2006;150:355-364.

Dooner H.K. Coordinate genetic regulation of flavonoid biosynthetic enzymes in maize. Mol. Gen. Genet. 1983;189:136-141.

Dubos C., Le Gourrierec J., Baudry A., Lanet E., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Alboresi A., Weisshaar B., Lepiniec L. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 2008;55:940-953.

Ferrandiz C., Liljegren S., Yanofsky M. FRUITFULL negatively regulates the SHATTERPROOF genes during Arabidopsis fruit development. Science. 2000;289:436-438.

Ferrandiz C., Pelaz S., Yanofsky M.F.Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. Annu. Rev. Biochem. 1999; 68:321-354.

Fitter D.W., Martin D.J., Copley M.J., Scotland R.W., Langdale J.A. GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. Plant J. 2002;31:713-727.

Flesch G., Rohmer M. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. Eur. J. Biochem. 1988;175:405-411.

Freed R.D., Everson E.H., Ringlund K., Gullord M. Seedcoat color in wheat and the relationship to seed dormancy and maturity. Cereal Res. Commun. 1976;4:147-149.

Fujisawa M., Nakano T., Ito Y. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. BMC Plant Biol. 2011;11(26):1-16.

Giliberto L., Perrotta G., Pallara P., Weller J., Fraser P.D., Bramley P.M., Fiore A., Tavazza M., Giovanni G. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. Plant Physiol. 2005;137:199-208.

Giovannoni J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. Plant Cell. 2004;16:170-180.

Goff S.A., Klein T.M., Roth B.A., Fromm M.E., Cone K.C., Radicella J.P., Chandler V.L. Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *B* regulating genes into maize tissue. EMBO J. 1990;9:2517-2522.

Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Llyod A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. Plant J. 2008;53: 814-827.

Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of *Pp* (*purple pericarp*) alleles. Euphytica. 2015;203:469-476.

Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. Mol. Biol. Evol. 2003;20:735-747.

Hichri I., Heppel S.C., Pillet J., Leon C., Czemmel S., Delrot S., Lauvergeat V., Bogs J. The basic helix–loop–helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. Mol. Plant. 2010;3:509-523.

Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat. Genome. 2005;48:747-754.

Himi E., Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor. Euphytica. 2005;143:239-242.

Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley *Ant1* and wheat *Rc* genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues. Mol. Genet. Genomics. 2015;290:1287-1298.

Hirschberg J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Current Opinion Plant Biol. 2001;4:210-218.

Hu J., Anderson B., Wessler R. Isolation and characterization of rice *R* genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. Genetics. 1996;142:1021-1031.

Hu J., Reddy V.S., Wessler S.R. The rice R gene family: two distinct subfamilies containing several miniature inverted repeat transposable elements. Plant Mol. Biol. 2000;42:667-678.

Itkin M., Seybold H., Breitel D., Rogachev I., Meir S., Aharoni A. TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. Plant J. 2009;60:1081-1095.

Jana B.K., Mukherjee S.K. Notes on the distribution of phytomelanin layer in higher plants – a short communication. J. Pharmaceutical Biol. 2014;4:131-132.

Johnson E.J. The role of carotenoids in human health. Nutr. Clin. Care. 2002;5:56-65.

Jung H.-J., Manoharan R.K., Park J.-I., Chung M.-Y., Lee J., Lim Y.-P., Hur Y., Nou I.-S. Identification of yellow pigmentation genes in *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis* using Br300 microarray. Int. J. Genomics. 2014;2014:1-12.

Kachanovsky D., Filler S., Isaacson T., Hirschberg J. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of *phytoenesynthase 1* expression by *cis*-carotenoids. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012;109(46): 19021-19026.

Karlova R., Rosin F.M., Busscher-Lange J., Parapunova V., Do P.T., Fernie A.R., Fraser P.D., Baxter C., Angenent G.C., de Maagd R.A. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. Plant Cell. 2011;23: 923-941.

Kerr E.A. Green flesh, gf. Rpt. Tomato Genet. Coop. Rep. 1956;6(17).

Khlestkina E.K. Regulatory-target gene relationships in allopolyploid and hybrid genomes. Ed. K.V. Urbano. Adv. Genetics Res. V. 3. NOVA Science Publishers, Inc, USA, 2010.

Khlestkina E.K. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. Cereal Res. Commun. 2013;41:185-198.

Khlestkina E.K. Current applications of wheat and wheat-alien precise genetic stocks. Mol. Breeding. 2014;34:273-281. DOI: 10.1007/s11032-014-0049-8

Khlestkina E.K., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S. Molecular and functional characterization of wheat near-isogenic line 'i:S29*Ra*' having intensive anthocyanin pigmentation of the coleoptile, culm, leaves and auricles. Plant Breeding. 2014;133:454-458.

Khlestkina E.K., Pestsova E.G., Röder M.S., Börner A. Molecular mapping, phenotypic expression and geographical distribution of genes determining anthocyanin pigmentation of coleoptiles in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 2002;104:632-637.

Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Börner A. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes. Cereal Res. Commun. 2009;37:391-398.

Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.). Euphytica. 2010;171:65-69.

Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome – a case study in bread wheat. BMC Plant Biology. 2008; 8:88.

Kobayashi S., Ishimaru M., Hiraoka K., Honda C. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. Planta. 2002;215:924-933.

Kolotilin I., Koltai H., Tadmor Y., Bar-Or C., Reuveni M., Meir A., Nahon S., Shlomo H., Chen L., Levin I. Transcriptional profiling of *high pigment-2*^{dg} tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of phytonutrients. Plant Physiol. 2007;145:389-401.

Kopsell D.A., Kopsell D.E. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. Trends Plant Sci. 2006;11(10): 499-507.

Lee J.M., Joung J.-G., McQuinn R., Chung M.-Y., Fei Z., Tieman D., Klee H., Giovannoni J. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SlERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. Plant J. 2012;70:191-204.

Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. Theor. Appl. Genet. 1999;98:226-233.

Lila A.M. Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. J. Biomed. Biotechnol. 2004;2004(5):306-313.

Lin Z., Hong Y., Yin M., Li C., Zhang K., Grierson D. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. Plant J. 2008;55:301-310.

Liu Y.S., Gur A., Ronen G., Causse M., Damidaux R., Buret M., Hieschberg J., Zamir D. There is more to tomato fruit color than candidate carotenoid. Plant Biotechnol. J. 2003;1:195-207.

Liu Y., Roof S., Ye Z., Barry C., Van Tuinent A., Vrebalov J., Bowler C., Giovannoni J. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004;26:9897-9902.

Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W. *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *C1*. Science. 1992;258:1773-1775.

Ludwig S.R., Habera L.F., Dellaporta S.L., Wessler S.R. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989;86:7092-7096.

Manning K., Tor M., Poole M., Hong Y., Thompson A., King G., Giovannoni J., Seymour G. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. Nat. Genet. 2006;38(8):948-952.

Martel C., Vrebalov J., Tafelmeyer P., Giovannoni J.J. The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. Plant Physiol. 2011;157:1568-1579.

Martin C., Prescott A., Mackay S., Bartlett J., Vrijlandt E. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. Plant J. 1991;1:37-49.

Matsui K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant J. 2008;55:954-967.

Matus J.T., Poupin M.J., Cañón P., Bordeu E., Alcalde J.A., Arce-Johnson P. Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Plant Mol. Biol. 2010;72: 607-620.

McClintock B. Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol. 1956;21:197-216.

Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev. 2000;52:673-751.

Nakamura H., Muramatsu M., Hakata M., Ueno O., Nagamura Y., Hirochika H., Takano M., Ichikawa H. Ectopic overexpression of the transcription factor OsGLK1 induces chloroplast development in non-green rice cells. Plant Cell Physiol. 2009;50(11):1933-1949.

Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques*. Plant Cell. 2000;12:1863-1878.

Nguyen C.V., Vrebalov J.T., Gapper N.E., Zheng Y., Zhong S., Fei Z., Giovannoni J.J. Tomato GOLDEN2-LIKE transcription factors reveal molecular gradients that function during fruit development and ripening. Plant Cell. 2014;26:585-601.

Orfila C., Huisman M.M.H., Willats W.G.T., van Alebeek G.J.W.M., Schols H.A., Seymour G.B., Knox J.P. Altered cell wall disassembly during ripening of Cnr tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. Puranta. 2002;215(3):440-447. DOI: 10.1007/s00425-002-0753-1

Osorio S. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions plant physiology. Plant Physiol. 2011;157: 405-425.

Palmieri S., Martiniello P., Soressi G.P. Chlorophyll and carotene content in high pigment and green flesh fruits. Rep. Tomat. Genet. Coop. 1978;28:10.

Pan I.L., McQuinn R., Giovannoni J.J., Irish V.F. Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. J. Exp. Bot. 2010;61:1795-1806.

Park H., Kreunen S.S., Cuttriss A.J., Dellapenna D., Pogson B.J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. Plant Cell. 2002;14:321-332.

Park K. A bHLH protein partially controls proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in the seed coats of morning glory *Ipomoea tricolor*. Hort. Environ. Biotechnol. 2012;53:304-309.

Park S.Y., Yu J.W., Park J.S., Li J., Yoo S.C., Lee N.Y., Lee S.K., Jeong S.W., Seo H.S., Koh H.J., Jeon J.S., Park Y.I., Paek N.C. The senescence-induced stay-green protein regulates chlorophyll degradation. Plant Cell. 2007;19:1649-1664.

Paz-Ares J., Ghosal D., Wienand U., Peterson P.A., Saedler H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO J. 1987;6:3553-3558.

Pelletier M.K., Shirley B.W. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase. Plant Physiol. 1996;111:339-345.

Petroni K., Cominelli E., Consonni G., Gusmaroli G., Gavazzi G., Tonelli C. The developmental expression of the maize regulatory gene Hopi determines germination-dependent anthocyanin accumulation. Genetics. 2000;155:323-336.

Petroni K., Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. Plant Sci. 2011;181:219-229.

Powell A.L., Nguyen C.V., Hill T., Cheng K.L., Figueroa-Balderas R., Aktas H. Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. Science. 2012;336:1711-1715.

Quattrocchio F., Wing J.F., Leppen H.T.C., Mol J.N.M., Koes R.E. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. Plant Cell. 1993;5:1497-1512.

Quattrocchio F., Wing J.F., van der Woude K., Mol J.N.M., Koes R. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. Plant J. 1998;13:475-488.

Quattrocchio F., Wing J., van der Woude K., Souer E., de Vetten N., Mol J., Koes R. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. Plant Cell. 1999;11:1433-1444.

Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix–loop–helix transcription factors of the anthocyanin pathway. Plant Cell. 2006;18:1274-1291.

Rausher M.D. The evolution of flavonoids and their genes. Ed. P.E. Grotewold. The Science of Flavonoids. N.Y.: Springer, 2008.

Reddy V.S., Scheffler B.E., Wienand U., Wessler S.R., Reddy A.R. Cloning and characterization of the rice homologue of the maize *C1* anthocyanin regulatory gene. Plant Mol. Biol. 1998;36:497-498.

Ríos G., Naranjo M.A., Rodrigo M.-J., Alós E., Zacarías L., Cercós M., Talón M. Identification of a GCC transcription factor responding to fruit colour change events in citrus through the transcriptomic analyses of two mutants. BMC Plant Biol. 2010;10(276):1-14.

Rossini L., Cribb L., Martin D.J., Langdale J.A. The maize golden2 gene defines a novel class of transcriptional regulators in plants. Plant Cell. 2001;13:1231-1244.

Saitoh K., Onishi K., Mikami I., Thidar K., Sano Y. Allelic diversification at the C (*OsC1*) locus of wild and cultivated rice: nucleotide changes associated with phenotypes. Genetics. 2004;7:997-1007.

Sakamoto W., Ohmori T., Kageyama K., Miyazaki C., Saito A., Murata M., Noda K., Maekawa M. The *Purple leaf* (*Pl*) locus of rice: the Pl^{w} allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. Plant Cell Physiol. 2001;42:982-991.

Sasaki K., Takahashi T. A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. Phytochemistry. 2002;61:339-343.

Selinger D.A., Chandler V.L. A mutation in the pale aleurone color1 gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. Plant Cell. 1999;11:5-14.

Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The regulation of anthocyanin synthesis in the wheat pericarp. Molecules. 2014;19:20266-20279. DOI: 10.3390/molecules191220266

Shoeva O.Yu., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Barley *Ant1* is a homolog of maize *C1* and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath. Plant Breeding. 2015;134:400-405.

Spelt C., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. *Anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix–loop–helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. Plant Cell. 2000;12:1619-1631.

Strack D., Vogt T., Schliemann W. Recent advances in betalain research. Phytochemistry. 2003;62:247-269.

Sun H., Fan H.-J., Ling H.-Q. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. BMC Genomics. 2015;16(9):1-12.

Tadiello A., Pavanello A., Zanin D., Caporali E., Colombo L., Rotino G.L., Trainotti L., Casadoro G. A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy Fruit. J. Exp. Bot. 2009;60:651-661.

Taylor L.P., Briggs W.R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. Plant Cell. 1990;2:115-127.

Tereshchenko O.Y., Arbuzova V.S., Khlestkina E.K. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes. J. Cereal Sci. 2013;57:10-13.

Toledo-Ortiz G., Huq E., Rodríguez-Concepción M. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. PNAS. 2010;107(25):11626-11631.

Vrebalov J., Pan I.L., Arroyo A.J.M., McQuinn R., Chung M., Poole M. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. Plant Cell. 2009;21:3041-3062.

Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Giovannoni J. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (Rin) locus. Science. 2002;296:343-345.

Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D., Gray J.C. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. Plant Cell. 1999;11:1337-1350.

Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A., Thomas M.R., Robinson S.P. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory gene. Plant J. 2007;49:772-785.

Welsch R., Maass D., Voegel T., Dellapenna D., Beyer P. Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. Plant Physiol. 2007;145:1073-1085.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiol. 2001;126:485-493.

Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne T., Llyod A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. Development. 2003;130:4859-4869.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):574-580
DOI 10.18699/VJ15.074

Влияние ограниченных интрогрессий от *Triticum timopheevii* Tausch. в геном мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на физиологические и биохимические признаки в условиях полива и засухи

Т.А. Пшеничникова[1], А.В. Пермяков[2], С.В. Осипова[2, 4], М.Д. Пермякова[2], Е.Г. Рудиковская[2], В.В. Верхотуров[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Иркутск, Россия
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет», Иркутск, Россия
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Межвидовая гибридизация у злаков используется как для сравнительного изучения строения и эволюции геномов, так и для извлечения из дикого генофонда полезных для селекции генов. Тетраплоидный вид пшеницы *Triticum timopheevii* давно используется как источник генов устойчивости к грибным болезням. Линия 821, созданная на генетическом фоне засухоустойчивого, но чувствительного к болезням сорта яровой пшеницы Саратовская 29 (С29), несет от этого вида интрогрессии в хромосомы 2А, 2В и в субтеломерный район длинного плеча хромосомы 5А. Два генотипа сравнили по параметрам, связанным с прямой и непрямой реакцией фотосинтетического аппарата на водный стресс. По сравнению с исходным сортом С29 во флаговых листьях линии 821 наблюдали повышенную скорость транспирации и устьичную проводимость (примерно в 4 раза в оптимальных и в 1,3 раза в вододефицитных условиях) и, соответственно, пониженную эффективность использования воды (в 1,6 раз в оптимальных и в 1,2 раза в вододефицитных условиях). Кроме того, в условиях водного стресса у линии 821 были снижены содержание хлорофиллов и каротиноидов, реальная эффективность фотосинтеза, скорость транспорта электронов в фотосистеме II, общая антиоксидантная способность (примерно в 3 раза) и повышена активность липоксигеназы (в 2 раза). В целом устойчивость к дефициту воды у линии снизилась по сравнению с родительским сортом, что сопровождалось подвяданием листьев. Таким образом, можно предположить, что хромосомы 2А, 2В и 5А засухоустойчивого сорта пшеницы С29 несут важные генетические факторы, контролирующие в растениях реакцию на водный стресс.

Ключевые слова: мягкая пшеница; *Triticum timopheevii*; интрогрессии; фотосинтез; флюоресценция хлорофилла; содержание пигментов в листе; активность антиоксидантных ферментов; засухоустойчивость.

Effects of limited introgressions from *Triticum timopheevii* Tausch. into the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on physiological and biochemical traits under normal watering and drought

T.A. Pshenichnikova[1], A.V. Permyakov[2], S.V. Osipova[2, 4], M.D. Permyakova[2], E.G. Rudikovskaya[2], V.V. Verchoturov[3]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia
[3] National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk, Russia
[4] Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Alien hybridization in cereals is used for comparative investigations of genome structure and evolution as well as for extracting useful genes from the wild gene pool. The tetraploid species *Triticum timopheevii* has long been used as a source of genes for resistance to fungal diseases. Line 821 was developed on the genetic background of cultivar Saratovskaya 29 (S29), which is drought-resistant but is very susceptible to diseases and carries big introgressions in 2A and 2B chromosomes and a small introgression in the subtelomeric region of 5A chromosome. The two genotypes were compared for the parameters associated with direct and indirect reaction of the photosynthetic apparatus to water stress. In flag leaves of 821 line, an increased transpiration rate and stomatal conductance (1.6 times the value in optimal watering and 1.2 times the value under water deficit) and, correspondingly, reduced water use efficiency were found compared to the initial cultivar. Additionally, the actual effectiveness and electron transport rate of photosystem II and chlorophyll and carotenoid content were reduced as well as the total antioxidant capacity (approximately three-fold) under

УДК 575.222.7:602.6:633.11.1
Поступила в редакцию 23.06.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: wheatpsh@bionet.nsc.ru

water stress. Under the same conditions, lipoxygenase activity was increased two-fold. On the whole, water deficit tolerance was decreased in the line in comparison with the parental cultivar and was accompanied by leaf senescence. Thus, it may be supposed that 2A, 2B and 5A chromosomes of the drought-tolerant cultivar S29 carry important genetic factors responsible for reaction to water stress in wheat plants.

Key words: bread wheat; *Triticum timopheevii*; introgressions; photosynthesis; chlorophyll fluorescence; pigment content in leaf; antioxidant enzyme activity; drought tolerance.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Пшеничникова Т.А., Пермяков А.В., Осипова С.В., Пермякова М.Д., Рудиковская Е.Г., Верхотуров В.В. Влияние ограниченных интрогрессий от *Triticum timopheevii* Tausch. в геном мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на физиологические и биохимические признаки в условиях полива и засухи. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):574-580. DOI 10.18699/VJ15.074

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Pshenichnikova T.A., Permyakov A.V., Osipova S.V., Permyakova M.D., Rudikovskaya E.G., Verchoturov V.V. Effects of limited introgressions from *Triticum timopheevii* Tausch. into the genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on physiological and biochemical traits under normal watering and drought. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):574-580. DOI 10.18699/VJ15.074

Отдаленная гибридизация между мягкой пшеницей (*Triticum aestivum* L.) и ее дикими сородичами широко используется в современных исследованиях для сравнительного изучения строения и эволюции геномов (Salina et al., 2006), а также с прикладной целью для извлечения полезных в селекции генов из генофонда диких видов, более приспособленных к изменяющимся условиям среды (Qi et al., 2007). Сравнительные физиологические исследования у отдаленных генотипов дают большие возможности для выявления лимитирующих звеньев продукционного процесса. Они позволяют установить, насколько изменились современные сорта в ходе селекции, как можно улучшить их адаптацию к неблагоприятным факторам среды. Однако дикие сородичи пшеницы и их производные формы чаще рассматриваются как источники генов устойчивости к болезням и вредителям. Гораздо реже они вовлекаются в морфофизиологические или биохимические исследования. В настоящее время наиболее изученными являются многочисленные эффекты различных пшенично-ржаных транслокаций на генетическом фоне мягкой пшеницы (Rabinovich, 1998; Ehdaie et al., 2003).

Тетраплоидный вид *Triticum timopheevii*, обладающий комплексной устойчивостью к болезням и вредителям (Жуковский, Мигушова, 1969), считается одним из перспективных источников генов иммунитета. В предыдущие годы в ИЦиГ СО РАН была создана коллекция интрогрессивных линий в генетической среде различных отечественных сортов пшеницы (Budashkina, 1988; Budashkina, Kalinina, 2001). Эти линии были вовлечены в многочисленные молекулярные и иммунологические исследования с целью выявления участков интрогрессии от *T. timopheevii* в геноме пшеницы, а также изучения содержащихся в них генов устойчивости к грибным заболеваниям (Leonova et al., 2001; Леонова и др., 2008; Тимонова и др., 2012). Также данные линии были изучены по составу запасных белков зерновки и хлебопекарным свойствам (Обухова и др., 2008). Одна из линий, 821, созданная на генетическом фоне сорта пшеницы Саратовская 29 (С29), значительно отличается от него по фенотипу. Она имеет более продолжительный период вегетации, остистый колос, длинное жесткое опушение на листьях, подобное родительскому виду *T. timopheevii*. Как было показано, она несет интрогрессии в хромосомах 2A, 2B и 5A (Leonova et al., 2001). Однако до сих пор не изучено влияние этих интрогрессий на какие-либо физиологические и биохимические признаки, связанные с высокой засухоустойчивостью, которой характеризуется исходный сорт С29.

Засуха индуцирует в растении множество физиологических и биохимических ответов (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Особенно чувствителен к водному дефициту фотосинтез, обеспечивающий образование биомассы растений. Снижение доступной почвенной влаги приводит к закрытию устьиц растения, уменьшению фотосинтетической ассимиляции углекислого газа. При этом с высокой скоростью продуцируется перекись водорода, которая представляет большую опасность для фотосинтеза, так как окисляет сульфгидрильные группы ключевых ферментов цикла Кальвина (Иванов, 2014). Кроме того, при засухе увеличивается продукция супероксидного радикала в фотосинтетической электрон-транспортной сети. В растениях наиболее значимыми и хорошо изученными водорастворимыми низкомолекулярными антиоксидантами являются аскорбиновая кислота (АК) и восстановленный глутатион (ВГТ). Они могут инактивировать активные формы кислорода напрямую либо в реакциях, катализируемых супероксид дисмутазой (СОД) и аскорбат пероксидазой (АП), обеспечивая защиту компонентов фотосинтеза, расположенных в строме хлоропласта (Foyer, Shigeoka, 2011; Gallie, 2013). Уровень АК в листьях пшеницы в условиях водного стресса поддерживается в основном путем регенерации ее окисленных форм дегидроаскорбат редуктазой (ДГАР) (Bartoli et al., 2005). Для регенерации аскорбата ДГАР использует восстановленный глутатион (ГSH), который поддерживается в этом состоянии за счет НАДФН в реакции, катализируемой глутатион редуктазой (ГР). Комплекс реакций образования H_2O_2, ее детоксикации и регенерации аскорбата в хлоропластах, включающий СОД, АП, ДГАР и ГР, называют аскорбат-глутатионовым (АК-ГSH) циклом (Asada, 1999),

протекающим в различных компартментах клеток. Наряду с ферментами АК-ГSH цикла важную роль в контроле накопления H_2O_2 в листьях пшеницы играет каталаза (Luna et al., 2005). В целом высокий антиоксидантный потенциал считается полезным для растений, так как повышает их толерантность к различным стрессам (Foyer, Shigeoka, 2011).

Устойчивость фотосинтетического аппарата растений формируется за счет изменения концентрации и перераспределения зеленых и желтых пигментов в светособирающем комплексе и/или в реакционном центре фотосистем. Важную роль здесь играют каротиноиды, которые участвуют в тушении триплетного состояния хлорофилла и предотвращают образование синглетного кислорода (Бухов, 2004).

Липоксигеназа, катализирующая присоединение молекулярного кислорода к полиненасыщенным жирным кислотам, может окислять липиды тилакоидных мембран. Это способствует деградации каротиноидов и хлорофиллов и отрицательно влияет на эффективность фотохимического использования энергии. Вместе с тем липоксигеназа защищает фотосинтетический аппарат при стрессе, участвуя в нефотохимическом тушении флюоресценции хлорофилла путем окисления ксантофилов в виалаксантиновом цикле (Jarén-Galán, Minguez-Mosquera, 1997), а также инициируя октадеканоидные защитные и сигнальные пути (Schaller, 2001).

Целью данной работы было сравнить линию 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* с исходным сортом по биомассе побега, ключевым параметрам газообмена и фотосинтеза, активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла, каталазы и липоксигеназы в условиях различного водообеспечения.

Материалы и методы

Объектом исследования служила линия 821, обладающая устойчивостью к бурой ржавчине и несущая маркированные молекулярными маркерами интрогрессии. Эта линия была получена скрещиванием сорта мягкой пшеницы С29 с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* ssp. *viticulosum*, последующим однократным беккроссированием на исходный сорт и отбором в потомстве цитологически стабильных, устойчивых к листовой ржавчине форм (Budashkina et al., 1988). Рекомбинантными являются хромосомы 2А, 2В (интрогрессии в короткое и частично – длинное плечо) и 5А (интрогрессия в субтеломерную область длинного плеча) (Leonova et al., 2001). Контролем служил родительский сорт С29.

Растения выращивали в почвенном субстрате в контролируемых условиях: 16-часовой фотопериод, влажность воздуха – 60 % и температурный режим – 23 °С/16 °С (день/ночь). Условия поддерживались проходной климатической камерой CLF Plant Master (CLF Plant Climatic GMBH, Вертинген, Германия), установленной на фитотроне СИФИБР СО РАН. Растения (по 10 зерен на образец) выращивали в сосудах Митчерлиха, заполненных почвенным субстратом (4 кг), при двух режимах водообеспечения – оптимальном и вододефицитном. Оптимальный режим соответствовал 60 %-му, а дефицитный – 30 %-му содержанию воды от полной почвенной влагоемкости, которую определяли, как описано в руководстве (Журбицкий, 1968). Водный режим поддерживали весовым методом, взвешивание проводили дважды в неделю. Дефицитный водный режим создавали начиная со стадии 3 листьев и поддерживали до окончания эксперимента на стадии стеблевания, когда проводился отбор растительного материала для анализов. Данная схема водообеспечения приблизительно соответствует естественным условиям выращивания яровой пшеницы в Западной Сибири, для которых характерна ранняя засуха. Все параметры изучали на стадии стеблевания. Биомассу главного побега определяли не менее чем у восьми растений. Показатели газообмена и фотосинтеза изучали на флаговых листьях растений с помощью портативной системы GFS-3000 (HeinzWalzGmbH, Эффельтрих, Германия) для изучения газообмена и флюоресценции хлорофилла. Измеряли следующие показатели: скорость транспирации, устьичную проводимость, скорость ассимиляции CO_2, или нетто-фотосинтез, потенциальную и реальную эффективность фотосистемы II, скорость транспорта электронов в фотосистеме 2 и нефотохимическое тушение флюоресценции. Эффективность использования воды была рассчитана как отношение нетто фотосинтез/транспирация. Все параметры измеряли в листьях шести растений каждого генотипа и при каждом режиме водообеспечения. У каждого растения все параметры измеряли не менее 8 раз. Содержание листовых пигментов (хлорофиллов ***a*** и ***b*** и каротиноидов) измеряли по методике Wettstein (1957) в листьях трех растений каждого генотипа и при каждом режиме водообеспечения. В каждом растении содержание пигментов определяли трижды. Ферментные экстракты получали из листьев трех отдельных растений каждого поливного варианта по ранее описанному методу (Osipova et al., 2013).

Активность ферментов определяли спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Маннедорф, Швейцария) в трех аналитических повторностях. При определении активности АП, ДГАР, ГР, КАТ и ЛОГ использовали УФ-прозрачные микропланшеты (Greiner Bio-One GmbH, Фриккенхаузен, Германия). Во всех случаях реакционная среда объемом 200 мкл содержала 10 мкл ферментного экстракта с известным содержанием белка, которое определяли по Bradford (1976) с использованием бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, Германия) в качестве стандарта. Активность АП (КФ 1.11.1.11) определяли, отслеживая снижение A_{290} в реакционной смеси, содержащей 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), 0,5 мМ аскорбиновую кислоту (Sigma-Aldrich, США) и 0,1 мМ H_2O_2 (коэффициент экстинкции E = 2,8 $мМ^{-1}см^{-1}$) (Nakano, Asada, 1981). Активность ДГАР (КФ 1.8.5.1) определяли по увеличению A_{265} в реакционной среде, содержащей 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), 0,2 мМ дегидроаскорбат (Sigma-Aldrich, США) и 2,5 мМ восстановленный глутатион (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия) (E = 14 $мМ^{-1}см^{-1}$) (Baier et al., 2000). Активность ГР (КФ 1.6.4.2) определяли, отслеживая окисление НАДФН при 340 нм (E = 6,2 $мМ^{-1}см^{-1}$) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 1 мМ НАДФН (Sigma-Aldrich, США) и 1 мМ окисленного

Таблица 1. Средние значения массы побега и показателей фотосинтеза у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	Масса побега, г		СТ (мМ м$^{-2}$с$^{-1}$)		УП (мМ м$^{-2}$с$^{-1}$)		СА (мкМ м$^{-2}$с$^{-1}$)		ЭИВ (А/Е)	
	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	4,72	3,48	0,318	1,302	22,4	102,0	1,84	5,28	6,4	4,1
Засуха	3,02	2,62	0,520	0,693	38,9	50,9	2,94	3,55	6,7	5,4
F_G	14,2***		130,8***		134,8***		165,0***		17,3***	
F_E	34,0***		16,2***		19,2***		4,0 н/д		3,3 н/д	

***$p < 0{,}001$; н/д – статистически недостоверно. СТ – скорость транспирации; УП – устьичная проводимость; СА – скорость ассимиляции CO_2; ЭИВ – эффективность использования воды.

Таблица 2. Средние значения содержания пигментов листа (мг/г сырой массы) у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	Хлорофилл ***a***		Хлорофилл ***b***		Каротиноиды	
	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	2,4	2,1	0,91	0,85	0,48	0,47
Засуха	2,1	1,8	1,0	0,78	0,56	0,44
F_G	6,03*		9,61**		8,57**	
F_E	7,60**		0,11 н/д		0,98 н/д	

*$p < 0{,}05$; **$p < 0{,}01$; н/д – статистически недостоверно.

глутатиона (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия) (de Lamotte, 2000). Активность КАТ (КФ 1.11.1.6) определяли, отслеживая разрушение H_2O_2 (E = 42,5 мМ$^{-1}$см$^{-1}$) при 240 нм в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 10 мМ H_2O_2 (Aebi, 1984). Активность ЛОГ (КФ 1.13.11.12) определяли, измеряя скорость образования пероксидов жирных кислот при 234 нм по методике, описанной ранее (Пермякова и др., 2010), модифицированной для микропланшетного ридера. Активность ферментов представлена в мкМ субстрата на мг белка в минуту при 25 °С. Общую активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (NBT) по известной методике (Giannopolitis, Ries, 1977) с некоторыми модификациями (Полесская и др., 2004). Реакционная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,8), 13 мМ метионина (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия), 2 мкМ рибофлавина (Reanal Private Ltd., Будапешт, Венгрия), 63 мкМ NBT (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мкМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 10 мкл ферментного экстракта. За единицу активности СОД принимали количество фермента, способного на 50 % подавить реакцию восстановления NBT.

Для оценки достоверности эффектов генотипа и условий водообеспечения на физиологические показатели растений применяли двухфакторный дисперсионный анализ. Однофакторная модель использовалась для сравнительной оценки средних одного генотипа. Расчеты проводили с помощью программы MS Excel.

Результаты

Водный дефицит угнетающе действовал на формирование биомассы побега как сорта С29, так и линии 821, однако родительский сорт превосходил линию по этому признаку независимо от условий выращивания (табл. 1). Они существенно различались по скорости транспирации в оптимальных условиях водоснабжения: у линии 821 она была в 4 раза выше. В условиях водного дефицита скорость транспирации у линии 821 снизилась в 2 раза, тогда как у сорта С29 – увеличилась в 1,8 раза. Это нетипично для большинства растений и, вероятно, связано со специфической реакцией на водный дефицит высокозасухоустойчивого сорта С29. Такие же тенденции наблюдали для устьичной проводимости: в оптимальных условиях устьичная проводимость у линии 821 была почти в 5 раз выше по сравнению с С29, снижаясь в условиях вододефицита в 2 раза. У С29 в условиях водного стресса этот показатель, наоборот, увеличивался. Ассимиляция CO_2 в оптимальных условиях у линии 821 была в 3 раза выше, чем у С29. Хотя двухфакторный анализ не выявил достоверных различий между средними значениями скорости ассимиляции в разных условиях водоснабжения (табл. 1), анализ достоверности различий между средними значениями каждого генотипа в контрастных условиях (однофакторная модель) показал их существенность (для С29 $F = 14{,}7$; для линии 821 $F = 179{,}1$, $p < 0{,}001$). При обоих вариантах водоснабжения эффективность использования воды у линии 821 была снижена по сравнению с исходным сортом, который, как отмечали его создатели (Ильина, 1989), обладает способностью сохранять высокую водоудерживающую способность листьев при засухе.

Два генотипа значимо различались по содержанию хлорофиллов ***a*** и ***b***, причем сорт С29 независимо от условий выращивания содержал больше хлорофилла, как ***a*** так и ***б*** (табл. 2). Содержание хлорофилла ***a*** у С29 и линии 821 одинаково снижалось в вододефицитных условиях

Таблица 3. Средние значения параметров флюоресценции хлорофилла у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	ПЭФ		РЭФ		СЭТ (мкМ·электронов $м^{-2}с^{-1}$)		НТФ	
	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	0,759	0,739	0,568	0,488	38,0	32,7	0,257	0,375
Засуха	0,776	0,786	0,55	0,494	36,8	33,1	0,282	0,304
F_G	1,2 н/д		74,4***		73,0***		11,8**	
F_E	46,4***		0,5 н/д		0,6 н/д		1,4 н/д	

**$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; н/д – статистически недостоверно. Эффективность фотосистемы II: ПЭФ – потенциальная, РЭФ – реальная; СЭТ – скорость транспорта электронов в фотосистеме 2; НТФ – нефотохимическое тушение флюоресценции.

Таблица 4. Средние значения активности дегидроаскорбат редуктазы (ДГАР), аскорбат пероксидазы (АП), глутатион редуктазы (ГР), каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и липоксигеназы (ЛОГ)у родительского сорта Саратовская 29 (С29) и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* в контрастных условиях полива

Условия выращивания	ДГАР		АП		ГР		КАТ		СОД		ЛОГ		∑ ДГАР, АП, ГР, КАТ, СОД	
	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821	С29	821
Полив	74,26	72,95	136,3	80,1	20,13	16,94	10,63	9,44	2,70	2,49	3,49	1,48	244,0	181,9
Засуха	113,80	90,34	313,8	105,9	22,83	17,56	6,54	8,99	2,51	2,50	2,72	5,88	665,0	225,3
F_G	4,9*		24,9***		12,9**		1,9 н/д		25,4***		0,9 н/д		–	–
F_E	25,7***		23,1***		2,0 н/д		25,4***		16,9***		8,6**		–	–

*$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; н/д – статистически недостоверно. ∑ ДГАР, АП, ГР, КАТ, СОД – сумма активностей антиоксидантных ферментов.

(табл. 2), тогда как хлорофилла ***b*** снижалось только у линии 821. По содержанию каротиноидов в оптимальных условиях генотипы не различались.

В условиях вододефицита в листьях С29 содержалось больше каротиноидов, что подтвердил однофакторной анализ этого признака ($F = 8,7$; $p < 0,05$). Более высокое содержание хлорофиллов и способность поддерживать высокий уровень каротиноидов в условиях дефицита воды, вероятно, способствуют лучшей адаптации фотосинтетического аппарата С29 по сравнению с линией 821.

Линия 821 уступала сорту С29 по реальной эффективности фотосинтеза и скорости транспорта электронов в фотосистеме II независимо от условий выращивания (табл. 3). Потенциальная эффективность фотосистемы II не отличалась у двух генотипов и достоверно возрастала в вододефицитных условиях. Нефотохимическое тушение флюоресценции было выше у линии 821.

В оптимальных условиях линия 821 существенно отличалась от исходного сорта по активности двух (АП и ЛОГ) из шести изученных ферментов, которая у линии была ниже в 1,7 и 2,4 раза соответственно (табл. 4). В условиях вододефицита линия 821 существенно уступала исходному сорту по активности ДГАР, АП и ГР, ферментов, играющих важную роль в поддержании восстановленного состояния редокс-пар «аскорбиновая кислота/дегидроаскорбиновая кислота» и «восстановленный глутатион/окисленный глутатион» и контролирующих в клетках уровень H_2O_2. По активности ЛОГ реакция на стресс кардинально различалась у двух генотипов. В листьях линии 821 активность ЛОГ значительно (почти в 4 раза) возрастала, а у С29, напротив, снижалась. Такое резкое повышение активности ЛОГ у менее устойчивого к засухе генотипа, вероятно, может объясняться необходимостью активизации защитных механизмов, связанных с липидным катаболизмом.

Обсуждение

Сорт яровой пшеницы С29, созданный в конце 1950-х годов в НИИСХ Юго-Востока, широко возделывался в СССР и до сих пор является непревзойденным по занимаемым площадям посевов. Он также вовлекался в разнообразные научные исследования и послужил генетической основой цитогенетических коллекций и коллекций интрогрессивных линий пшеницы (Budashkina, 1988; Arbuzova et al., 1996). Сорт хорошо изучен по морфологическим признакам и отличается высокой засухоустойчивостью (Ильина, 1989). К отрицательным свойствам сорта относится его низкая устойчивость к грибным заболеваниям. Для улучшения этого признака в сорт путем гибридизации были интрогрессированы участки генома тетраплоидного вида *T. timopheevii* (Budashkina, 1988), обладающего комплексной устойчивостью к ряду фитопатогенов. Линия 821 из этой коллекции обладает устойчивостью к листовой ржавчине (Леонова и др., 2008) и несет интрогрессии в хромосомы 2A, 2B и 5A, выявленные с помощью микросателлитных маркеров (Leonova et al., 2001). Также обнаружено, что эта линия имеет высокое содержание клейковины в зерне и отличные хлебопекарные качества (Обухова и др., 2008).

Как показали наши исследования, у линии 821 интрогрессии в хромосомы 2A, 2B и 5A оказали влияние на физиологические и биохимические характеристики флагового листа и ее устойчивость к водному дефициту. Интрогрессии привели к существенному увеличению

транспирации и устьичной проводимости линии 821, вследствие чего эффективность использования воды была существенно снижена по сравнению с исходным сортом. По имеющимся данным (Осипова и др., неопубл. данные), локусы количественных признаков, ответственные за устьичный контроль фотосинтеза, локализованы на хромосомах пшеницы второй гомеологической группы, и, вероятно, этот эффект обусловлен интрогрессиями в хромосомы 2A и 2B. У C29 в условиях водного дефицита почти пропорционально (в 1,6–1,7 раз) повышались все показатели газообмена, в отличие от линии 821, и, как следствие, ЭИВ в условиях стресса поддерживалась на высоком уровне. Наши результаты согласуются с данными ранее проведенного эксперимента, в котором сорт пшеницы C29 выращивался в условиях острой засухи, при 10 % влажности почвы от нормы. Было обнаружено, что в этих условиях не происходит значительного снижения ассимиляции CO_2 (Давыдов, 2007). Это объяснялось 1,5–3,0-кратным увеличением числа устьиц на обеих сторонах листа во время засухи, что способствует поддержанию уровня ассимиляции CO_2 в условиях снижения размеров и биомассы листа.

Линия 821 уступала исходному сорту C29 по комплексу параметров, характеризующих ФСА: скорости транспорта электронов в фотосистеме II, реальной эффективности фотосинтеза, содержанию хлорофиллов ***a*** и ***b***, содержанию каротиноидов, которые участвуют в рассеивании излишней световой энергии и защищают фотосинтетический аппарат от фотоокисления.

Интрогрессированная линия существенно отличалась от исходного сорта по активности ферментов, являющихся важными компонентами прооксидантных (ЛОГ) и антиоксидантных (КАТ, СОД, АП, ДГАР и ГР) систем. В условиях стресса суммарная активность ферментов-антиоксидантов в листьях C29 была почти в 3 раза выше, чем у линии 821, а активность ЛОГ – в 2 раза ниже.

Существенные различия в активности ДГАР, АП и ГР у изученных генотипов, вероятно, связаны с эффектом интрогрессий в хромосомы 2A и 2B, так как ранее (Osipova et al., 2013) у межсортовых замещенных по хромосомам 2-й гомеологической группы линий C29 (Janetzkis Probat) была обнаружена значительная вариабельность этого признака. Также известно, что структурные гены СОД находятся в длинных плечах хромосом 2-й гомеологической группы (Neuman, Hart 1986). Li с коллегами (1999) выявили соответствующие генные последовательности.

Значительные различия в активности ЛОГ у изученных генотипов при поливе и при засухе свидетельствуют о том, что участки интрогрессии несут генетический фактор, определяющий активность этого фермента. Вероятно, он находится на рекомбинантном участке хромосомы 5AL, так как в этой области ранее были картированы гены гомеоаллельной серии *Lpx-2*, кодирующие одну из изоформ этого фермента (McIntosh et al., 2013).

Таким образом, интрогрессия в три хромосомы сорта пшеницы C29 от *T. timopheevii* привела к повышению транспирации и устьичной проводимости, снижению эффективности использования воды, ключевых характеристик фотосинтеза и антиоксидантной способности в тканях листа. В результате листья линии 821 в условиях дефицита воды подвядали, теряя тургор. Это говорит о том, что хромосомы 2A, 2B и 5A исходного сорта C29 несут важные генетические факторы, обеспечивающие физиологические и биохимические механизмы высокой засухоустойчивости. Дальнейшее извлечение из генотипа линии 821 отдельных участков интрогрессии путем создания однохромосомных замещенных и изогенных линий позволит более подробно изучить генетический контроль физиологических и биохимических процессов, участвующих в адаптации к стрессу.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № VI.53.1.3 (подготовка генетического материала) и проекта РФФИ № 15-04-02762 (определение физиологических и биохимических характеристик). В работе использовалось оборудование ЦКП «Фитотрон» СИФИБР СО РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бухов Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза. Физиология растений. 2004;51(6):825-837.

Давыдов В.А. Количественные характеристики устьичного аппарата растений яровой пшеницы сорта Саратовская 29 при остром дефиците воды. Сельскохозяйственная биология. 2007;5:90-93.

Жуковский П.М., Мигушова Э.Ф. Наиболее высокоиммунный эндемичный генофонд для выведения устойчивых сортов пшеницы путем отдаленной гибридизации. Вестн. с.-х. науки. 1969; 2:9-20.

Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968.

Иванов Б.Н. Роль аскорбиновой кислоты в фотосинтезе (обзор). Биохимия. 2014;79(3):364-372.

Ильина Л.Г. Селекция яровой мягкой пшеницы на Юго-Востоке. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1989.

Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н. П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующих устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине. Генетика. 2008;44:1652-1659.

Обухова Л.В., Будашкина Е.Б., Ермакова М.Ф., Калинина Н.П., Шумный В.К. Качество зерна и муки у интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генами устойчивости к листовой ржавчине от *Triticum timopheevii* Zhuk. С.-х. биология. 2008;5:38-42.

Пермякова М.Д., Труфанов В.А., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф. Роль липоксигеназы в определении качества зерна пшеницы. Прикладная биохимия и микробиология. 2010;46(1):96-102.

Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде. Физиол. растений. 2004;51(5):686-691.

Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. Вавил. журн. генет. и селекции. 2012;16(1):142-159.

Aebi H. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 1984;105:121-126.

Arbuzova V.S., Efremova T.T., Laikova L.I., Maystrnko O.I., Popova O.M., Pshenichnikova T.A. The development of precise genetic stocks in two wheat cultivars and their use in genetic analysis. Euphytica. 1996;89:11-15.

Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999;50:601-639.

Baier M., Noctor G., Foyer C., Dietz K.J. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxinin Arabidopsis specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. Plant Physiol. 2000;124:823-832.

Bartoli C.G., Guiamet J.J., Kiddle G., Pastori G.M., Cagno R.D., Theodoulou F.L., Foyer C.H. Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. Plant, Cell Env. 2005;28:1073-1081.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 1976;72:248-254.

Budashkina E. Cytogenetic study of introgressive disease-resistant common wheat lines. Tag. Ber. Acad. Landwirtsch. Wiss. DDR. 1988;206:209-212.

Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust. Acta Phytopathol. Entomol. 2001;36:61-65.

de Lamotte F., Vianey-Liaud N., Duviau M., Kobrehel K. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and Characterization. J. Agric. Food Chem. 2000;48:4978-4983. DOI: 10.1021/jf0003808

Ehdaie B., Whitkus R.N., Waines S.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;43:710-717.

Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. Plant Physiol. 2011;155: 93-100.

Gallie D.R. L-Ascorbic Acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. Scientifica. 2013;2013. Article ID 795964, 24 p. DOI:10.1155/2013/795964

Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide Dismutase. 1. Occurrence in Higher Plants. Plant Physiol. 1977;59:309-314.

Jarén-Galán M., Minguez-Mosquera M.I. β-caroten and capsanthin co-oxidation by lipoxygenase. Kinetic and Thermodynamic aspects of the reaction. J. Agric. Food Chem. 1997;45:4814-4820.

Leonova I.N., Kalinina N.P., Budashkina E.B., Röder M.S., Salina E.A. Comparative molecular and genetic analysis of *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* hybrid lines resistant to leaf rust. EWAC Newslett. 2001. Proc. 11th EWAC Conf., Novosibirsk, Russia, 24–28 July, 2000. Ed. T.A. Pshenichnikova, A.J. Worland.

Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. Theor. Appl. Genet. 1999;98:226-233.

Luna C., Pastory G., Driscoll S., Groten K. Drought control on H_2O_2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. J. Exp. Bot. 2005;56:417-423. DOI: 10.1093/jxb/eri039

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J, Morris C, Appels R., XC Xia Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013. 12th Intern. Wheat Genet. Symp., 8–13 September 2013, Yokohama, Japan.

Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 1981; 22:867-880.

Neuman P.R., Hart G.E. Genetic control of the mitochondrial form of superoxide dismutase in hexaploid wheat. Biochem. Genet. 1986; 24:435-446.

Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Pshenichnikova T.A., Genaev M.A., Börner A. The antioxidant enzymes activity in leaves of inter-varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit. Acta Physiol. Plant. 2013;35:2455-2465.

Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. Chromosome Res. 2007;15:3-19.

Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocation for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. Euphytica. 1998;100: 323-340.

Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. Funct. Integr. Genomics. 2006;6:71-80.

Schaller F. Enzymes of biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. J. Exp. Bot. 2001;52(354):11-23.

Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J. Expt. Bot. 2007;58:221-227. DOI: 10.1093/jxb/erl164

Wettstein D. Chlorophyll-letale und der submikroskopische form wechsel der Plastiden. Exp. Cell Res. 1957;12:427–506.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):581-588
DOI 10.18699/VJ15.075

Взаимосвязь аллозимного и фенотипического разнообразия популяций ели аянской (*Picea ajanensis*)

В.П. Ветрова[1], А.К. Экарт[2], А.Н. Кравченко[2], А.Я. Ларионова[2]

[1] Камчатский филиал Тихоокеанского института географии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Петропавловск-Камчатский, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия

Проведено сравнение структуры популяций ели аянской (*Picea ajanensis*) по результатам аллозимного анализа тканей вегетативных почек и морфометрического анализа генеративных органов. Исследовали шесть ценопопуляций *P. ajanensis*, произрастающих на полуострове Камчатка в районах с разным уровнем вулканического воздействия. Генетическая изменчивость ели определена на основании анализа 10 ферментных систем (*PGM*, *GOT*, *HK*, *LAP*, *MDH*, *SKDH*, *IDH*, *GDH*, *PGI*, *SOD*). Фенотипическое разнообразие оценивали по составу морфотипов, выделенных методами геометрической морфометрии по форме семенных чешуй шишек. При попарном сравнении выборок шишек со 170 деревьев из шести популяций было выделено 12 морфотипов. Проведена сравнительная оценка разнообразия и сходства популяций по частоте встречаемости морфотипов и частоте аллелей полиморфных локусов. Выявлена корреляция матриц генетических и фенотипических расстояний между группами деревьев разных морфотипов, что согласуется с генетической детерминацией формы семенных чешуй шишек у ели. По совокупности 9 полиморфных локусов (*Got*-2, *Skdh*-1, *Idh*-2, *Pgm*-2, *Mdh*-1, *Mdh*-3, *Pgm*-1, *Pgi*-2, *Hk*) генетические различия между группами деревьев разных морфотипов были незначительными. Достоверные различия между морфотипами ели были выявлены по двум локусам: *Pgm*-2 и *Mdh*-1. Различия в генетическом разнообразии популяций в основном согласуются с различиями в их фенотипическом разнообразии. Высокий уровень генетического и фенотипического разнообразия характеризует стабильную популяционную структуру ели в подзоне слабых пеплопадов. Изменения в генетической структуре и низкий уровень фенотипического разнообразия ели наблюдаются при катастрофическом вулканическом воздействии.

Ключевые слова: аллозимный полиморфизм; фенотипическая изменчивость; морфология шишек; *Picea ajanensis*.

Relationships between the allozyme and phenotypic diversities of *Picea ajanensis* populations

V.P. Vetrova[1], A.K. Ekart[2], A.N. Kravchenko[2], A.Ya. Larionova[2]

[1] Kamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute Far East Branch of the RAS, Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia
[2] V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

The structures of *Picea ajanensis* populations were compared based on allozyme analysis of vegetative buds and morphometric analysis of generative organs. Six cenopopulations of *P. ajanensis* were investigated in areas with various levels of volcanic impact in the Kamchatka Peninsula. The genetic structures of spruce populations and phenotypes were determined by analysis of ten enzyme systems (*PGM*, *GOT*, *HK*, *LAP*, *MDH*, *SKDH*, *IDH*, *GDH*, *PGI* and *SOD*). Phenotypic variability of spruce populations was estimated based on the composition of morphotypes that were identified by using geometric morphometrics of cone-scale shapes. Pairwise comparison of samples of cones from 170 trees from six populations revealed 12 morphotypes differing in the shape of cone scales. Comparative assessment of variability and similarity of populations was carried out based on the frequency of occurrence of phenotypes and frequency of alleles of polymorphic loci. Correlations of the genetic and phenotypic distance matrices between different phenotypes were revealed. This observation was consistent with the genetic determination of the shape of cone scales in spruce. Genetic differences between the morphotypes with regard to nine polymorphic loci (*Got*-2, *Skdh*-1, *Idh*-2, *Pgm*-2, *Mdh*-1, *Mdh*-3, *Pgm*-1, *Pgi*-2, and *Hk*) were not significant. Statistically significant differences between the morphotypes were revealed for two loci: *Pgm*-2 and *Mdh*-1. Differences in the genetic diversity of spruce populations generally corresponded to differences in their phenotypic diversity. The high levels of genetic and phenotypic diversity characterized a stable population structure of spruce in the area of weak volcanic influence. Changes in the genetic structure and low levels of the phenotypic diversity of spruce were observed under catastrophic volcanic impact.

Key words: allozyme polymorphism; phenotypic diversity; cone morphology; *Picea ajanensis*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?
Ветрова В.П., Экарт А.К., Кравченко А.Н., Ларионова А.Я. Взаимосвязь аллозимного и фенотипического разнообразия популяций ели аянской (*Picea ajanensis*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):581-588. DOI 10.18699/VJ15.075

HOW TO CITE THIS ARTICLE?
Vetrova V.P., Ekart A.K., Kravchenko A.N., Larionova A.Ya. Relationships between the allozyme and phenotypic diversities of *Picea ajanensis* populations.Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):581-588. DOI 10.18699/VJ15.075

УДК 575.174.015.3:582.475.2
Поступила в редакцию 12.12.2014 г.
Принята к публикации 05.03.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: v.vetrova@mail.ru

Проблема изучения и оценки феногенетической изменчивости и необходимость синтеза генетического и фенотипического анализа популяций являются одной из наиболее актуальных в популяционной биологии (Алтухов, 2003; Санников, Петрова, 2003, 2007). Система методов изучения таксономической структуры древесных растений на популяционно-генетической основе, объединяющей принципы и методы фенотипического и генетического анализа популяций, разработана и апробирована на примере сосны обыкновенной С.Н. Санниковым и И.В. Петровой (2003, 2007). В качестве фенотипических маркеров для оценки внутри- и межвидовой дифференциации разных представителей семейства *Pinaceae,* как правило, используют полигенные признаки генеративных органов, включая характеристики размеров и индексы формы шишек, семян и семенных чешуй (Мамаев, 1972; Фролов, 1993; Попов, 2005; Путенихин и др., 2005).

Ключевым направлением исследований по феногенетике растений является разработка количественных методов сопряженного фенотипического и генетического анализа популяций (Санников, Петрова, 2007). При оценке фенотипической изменчивости хвойных перспективным является анализ изменчивости генеративных органов растений методами геометрической морфометрии. Эффективность этого подхода для анализа изменчивости и дифференциации популяций была показана на примере кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) (Vetrova, 2013; Ветрова, Синельникова, 2014).

Цель настоящей работы – анализ взаимосвязи аллозимного и фенотипического разнообразия популяций ели аянской (*Picea ajanensis* (Lindl. ex Gord.) Fisch. ex Carr. син. *Picea jezoensis* (Siebold et Zucc.). Исследовали природные популяции ели аянской на полуострове Камчатка. Ранее с помощью аллозимных и фенотипических маркеров нами получены данные, свидетельствующие о генетической и фенотипической гетерогенности популяций ели аянской в этом районе и о связи изменчивости со степенью вулканического воздействия (Ветрова и др., 2014). В задачи настоящей работы входило выделение морфотипов ели аянской по форме семенных чешуй шишек методами геометрической морфометрии, сравнение генетических характеристик морфологически различных групп деревьев на основе изоферментного анализа, оценка разнообразия и сходства популяций по частоте встречаемости морфотипов и частоте аллелей полиморфных локусов.

Материалы и методы

В исследование включено шесть ценопопуляций ели аянской из северных и южных районов «хвойного острова» Центральной Камчатки. Три северные ценопопуляции расположены в районах активного вулканизма: на юго-западном подножии вулкана Шивелуч (Е6) и на западном подножии вулкана Ушковский (Е1 и Е2), на территориях, вышедших в разное время из-под действия сухих речек, а три выборки (Е3, Е4 и Е5) были расположены в зоне слабых пеплопадов в южном районе Центральной камчатской депрессии (ЦКД), в равнинных и долинных ельниках (табл. 1).

Материалом для исследования послужили вегетативные почки и шишки, собранные с 28–30 деревьев в каждой из шести ценопопуляций в сентябре–октябре 2012 г. Все исследованные древостои были разновозрастными. Отбор образцов проводили на деревьях, высота которых составляла 5–7 м, а возраст, по данным дендрохронологического анализа, 60–80 лет.

При анализе изменчивости формы семенных чешуй применяли методические указания по геометрической морфометрии, изложенные в обзорной статье И.Я. Павлинова и Н.Г. Микешиной (2002) и в монографии M. Zelditch и др. (2004). Выполнена геометрическая морфометрия семенных чешуй шишек у 170 деревьев ели аянской из шести ценопопуляций. С каждого дерева выбирали по 3 шишки, из средней части шишек брали по пять чешуй, затем из этих 15 образцов выбирали наиболее репрезентативные пять чешуй для каждого дерева. Расстановку меток и определение их координат выполняли на сканированных изображениях чешуй с помощью экранного дигитайзера (Rolf, 2010).

Семенные чешуи относятся к билатерально симметричным структурам, поэтому для характеристики их формы были выбраны 11 меток на одной стороне чешуй. На рис. 1 показана расстановка меток по контуру чешуй в соответствии с угловым алгоритмом. Метки 1 и 2 были поставлены на оси симметрии у основания и верхушки чешуй (рис. 1, *а*), метка 3 соответствует точке изгиба оттянутой верхушки чешуй, метка 4 – точке пересечения боковой линии чешуй с линией, проведенной перпендикулярно оси симметрии из ее центра. Остальные метки (5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11) расставлены в соответствии с угловым алгоритмом: под углом 20, 35, 50, 70, 115, 135 и 155 градусов к оси симметрии соответственно (рис. 1, *а*).

Исходные координаты меток нормировали с помощью Прокрустова совмещения выборки чешуй со средней конфигурацией в программе CoordGen6 (Sheets, 2001). Обработку и анализ данных проводили с помощью пакета IMP-программ (Integrated Morphometrics Programs). Для выделения морфотипов индивидуальные выборки семенных чешуй со всех 170 деревьев сравнивали попарно в программе Twogroup по критерию Гудолла (Goodall'test) для частных Прокрустовых расстояний с использованием бутстрэп-ресамплинга (Sheets, 2001). К разным морфотипам по форме семенных чешуй относили деревья, образцы чешуй шишек которых по критерию Гудолла достоверно различались при уровне значимости $p \leq 0{,}05$. Деревья сходных морфотипов объединялись в группы, которые сравнивались по генетическому разнообразию. По составу и частоте морфотипов были рассчитаны показатели фенотипического разнообразия (μ) и сходства популяций (r), фенотипические расстояния (D) между выборками (Животовский, 1991) по формулам, приведенным ниже:

$$\mu = \left(\sum_{i=1}^{m}\sqrt{p_i}\right)^2;\ r = \sum_{i=1}^{m}\sqrt{p_i q_i};\ D = \frac{2\sqrt{2}}{\pi}\sqrt{1-r},$$

где m – общее число морфотипов, обнаруженных во всех выборках; p_i, q_i – частоты морфотипов в сравниваемых популяциях.

Генетическая изменчивость ели определялась с помощью аллозимного анализа тканей вегетативных почек. Гомогенизацию вегетативных почек для изоферментного анализа осуществляли в 1–2 каплях экстрагирующего

Таблица 1. Характеристика пробных площадей, на которых проводили сбор материала

Код выборки	Географические координаты	Положение в рельефе
E1	56°03′09″ с.ш. 160°03′02″ в.д.	Северная часть ЦКД, подножье вулкана Ушковский, старое русло сухой речки, 175 м над ур. моря
E2	56°03′07″ с.ш. 160°00′47″ в.д.	Северная часть ЦКД, окр. пос. Козыревск, равнинное местообитание, 170 м над ур. моря
E3	55° 04′ 37″ с.ш. 158° 53′13″ в.д.	Средняя часть ЦКД, равнинное местообитание, 176 м над ур. моря
E4	55° 36′ 16″ с.ш. 159° 27′ 40″ в.д.	Средняя часть ЦКД, равнинное местообитание, 90 м над ур. моря
E5	55° 19°′ 39″ с.ш. 159°15′ 11″ в.д.	Средняя часть ЦКД, надпойменная терраса р. Камчатка, 145 м. над ур. моря
E6	56 °32′ 11″ с.ш. 161° 02′ 15″ в.д.	Северная часть ЦКД, подножье вулкана Шивелуч, юго-западный склон, 150 м над ур. моря

ЦКД – Центральная Камчатская депрессия.

буфера 0,05 М Трис-HCl pH 7,7, содержащего дитиотрейтол (0,06 %), трилон Б (0,02 %) и β-меркаптоэтанол (0,05 %). Разделение экстрактов проводили методом горизонтального электрофореза в 13 %-м крахмальном геле. Каждый экстракт исследовали в трех буферных системах: морфолин-цитратной, pH = 7,0 (Clayton, Tretiak, 1972), трис-цитратной, pH = 8,5/гидроокись лития-боратной, pH = 8,1 (Ridgway et al., 1970) и трис-ЭДТА-боратной, pH 8,6 (Markert, Faulhaber, 1965). Гистохимическое окрашивание ферментов осуществляли по стандартным методикам (Brewer, 1979; Vallejos, 1983; Гончаренко, Падутов, 1988; Manchenko, 1994), адаптированным к объекту изучения. Выявленные зоны активности ферментов, как и кодирующие их локусы, нумеровали в порядке убывания их электрофоретической подвижности. Аллели обозначали в соответствии с подвижностью кодируемых ими аллозимов относительно наиболее распространенного аллозима, подвижность которого принимали за 100 (Айала, 1984). На рис. 2 представлены примеры электрофореграмм изоцитратдегидрогеназы и глутаматоксалоацетаттрансаминазы ели аянской.

В ходе предварительного анализа в образцах почек из камчатских популяций ели аянской нами было идентифицировано 15 изоферментных локусов (Ветрова и др., 2014), которые ранее использовались в

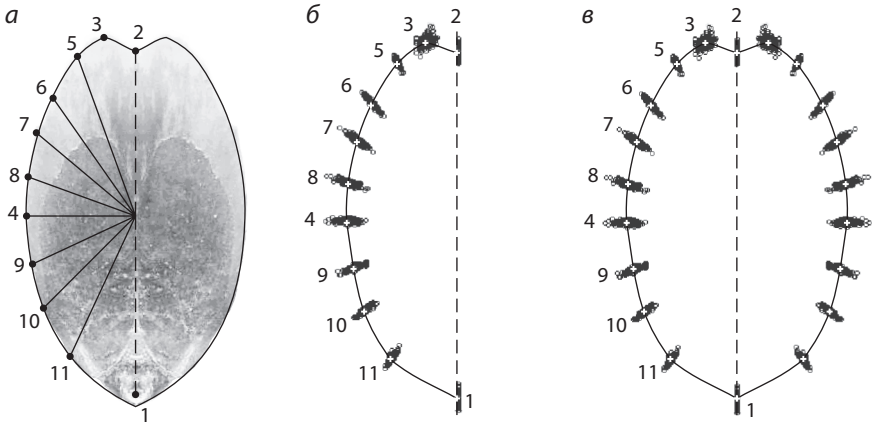


Рис. 1. Геометрическая морфометрия семенных чешуй шишек ели аянской: *а* – расстановка меток по контуру чешуй; *б* – совмещение выборки чешуй (*N* = 170) со средней конфигурацией методом скользящей базовой линии; *в* – дублирование и отражение от оси симметрии координат меток для получения полного изображения чешуй.

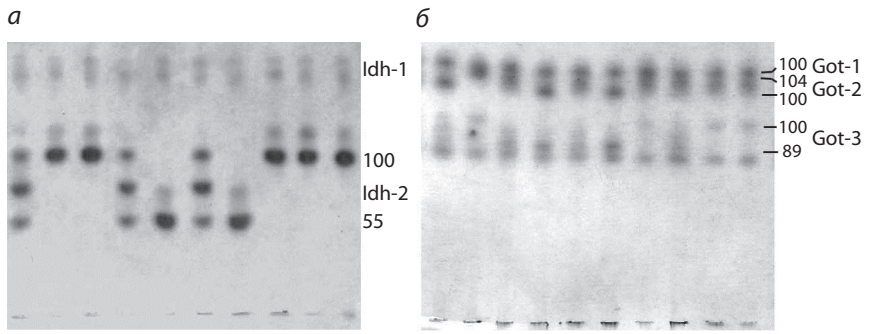


Рис. 2. Электрофореграммы изоцитратдегидрогеназы (*а*) и глутаматоксалоацетаттрансаминазы (*б*) ели аянской.

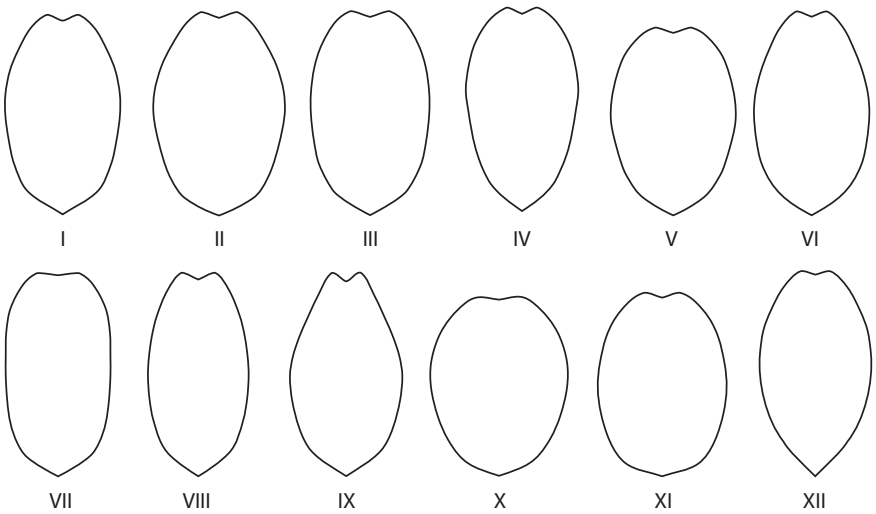


Рис. 3. Разнообразие форм семенных чешуй шишек в исследованных популяциях *P. ajanensis*.

Цифрами обозначены номера морфотипов.

качестве маркеров в генетических исследованиях этого вида (Potenko, 2007). Был выполнен электрофоретический анализ десяти ферментных систем: фосфоглюкомутазы (*PGM*, EC 2.7.5.1), глутаматоксалоацетаттрансаминазы (*GOT*, EC 2.6.1.1), гексокиназы (*HK*, 2.7.1.1), лейцинамипептидазы (*LAP*, EC 3.4.11.1), малатдегидрогеназы (*MDH*, EC 1.1.1.37, шикиматдегидрогеназы (*SKDH*, EC 1.1.1.25), изоцитратдегидрогеназы (*IDH*, EC 1.1.1.42), глутаматдегидрогеназы (*GDH*, EC 1.4.2.3), фосфоглюкоизомеразы (*PGI*, EC 5.3.1.9) и супероксиддисмутазы (*SOD*, 1.15.1.1).

Для определения генетического разнообразия групп деревьев, выделенных по сходству формы семенных чешуй, так же как и для ценопопуляций ели, по 15 локусам рассчитывали общепринятые показатели изменчивости: процент полиморфных локусов (P), среднее число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), среднюю наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности. Генетическую структуру морфотипов и популяций определяли с помощью показателей F-статистик Райта (Guries, Ledig, 1982). Количественную оценку степени генетических различий между морфотипами производили по методу, предложенному М. Неи (Nei, 1972). Расчет показателей осуществлялся в компьютерной программе GenAlex 6 (Peakall, Smouse, 2006). Для оценки достоверности генетических различий между морфотипами по частотам аллелей 15 локусов использовали критерий χ^2.

Результаты

При попарном сравнении индивидуальных выборок шишек со 170 деревьев было выделено 12 морфологических форм ели по конфигурации семенных чешуй. Средние конфигурации всех морфотипов семенных чешуй, полученные в программе CoordGen6f (Sheets, 2001), показаны на рис. 3.

Частота встречаемости разных морфотипов в общей выборке деревьев ели варьирует от 1,2 % до 24 %. Наибольшая частота встречаемости отмечена для двух морфотипов: II (23,5 %) и III (24,1 %). К редким морфотипам относятся X, XI XII с частотой встречаемости 1,2 %, а также IV и VIII (1,8 %).

Частоты аллелей изученных изоферментных локусов у выделенных морфотипов ели аянской приведены в табл. 2. Мономофными являются шесть из пятнадцати проанализированных изоферментных локусов ели аянской (*Got*-1, *Lap*-2, *Mdh*-2, *Sod*-1, *Sod*-2, *Gdh*). К категории высокополиморфных относятся четыре локуса (*Got*-2, *Skdh*-1, *Idh*-2, *Pgm*-2), среднеполиморфных – три локуса (*Mdh*-1, *Mdh*-3, *Pgm*-1). Два локуса (*Pgi*-2, *Hk*) слабополиморфны. Обнаруженные в этих локусах альтернативные основному аллели встречаются не во всех морфотипах (табл. 2). Два из них, $Pgi\text{-}2^{66}$ и $Pgi\text{-}2^{90}$, являются редкими: $Pgi\text{-}2^{66}$ отмечен только в морфотипе II (частота 1,3 %), $Pgi\text{-}2^{90}$ – только в морфотипе V (частота 3,1 %). Еще один редкий аллель обнаружен в локусе *Pgm-1* ($Pgm\text{-}1^{96}$), он отмечен только в морфотипе I (2,1 %). Всего в 15 локусах выявлено 27 аллелей.

Сравнение морфотипов ели на достоверность различий между ними по частотам аллелей девяти полиморфных локусов показали, что по совокупности этих локусов различия были несущественные, однако по двум локусам (*Pgm-2* и *Mdh-1*) выявлены различия для 8 пар сравниваемых морфотипов на уровне значимости $p \leq 0{,}05$ (табл. 3). Достоверные различия по частотам аллелей локуса *Pgm-2* выявлены при сравнении морфотипа VII со всеми остальными морфотипами, а различия по частотам аллелей локуса *Mdh-1* выявлены между морфотипами V, II и III (табл. 3).

Параметры генетического разнообразия для деревьев каждого из выделенных морфотипов ели аянской приведены в табл. 4. Из представленных данных видно, что процент локусов, обнаруживающих изменчивость, варьирует в группах деревьев, выделенных по форме семенных чешуй, от 40 % до 60 %. Среднее число аллелей на локус изменяется от 1,400 до 1,667, эффективное число аллелей – от 1,202 до 1,307. Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности варьируют в пределах от 0,120 до 0,183 и от 0,124 до 0,181 соответственно. Наиболее высокие значения практически всех показателей генетического разнообразия наблюдаются в группе деревьев морфотипа V, наиболее низкие – у деревьев морфотипа VII (табл. 4). Выборка деревьев с морфотипом IX при низких значениях полиморфности и среднем числе аллелей на локус характеризуется довольно высокой наблюдаемой гетерозиготностью.

Оценка степени генетической дифференциации основных семи изученных морфотипов ели аянской проводилась на основе генетических расстояний D (Nei, 1972), рассчитанных по частотам аллелей всех

Таблица 2. Частоты аллелей 15 изоферментных локусов в группах деревьев семи основных морфотипов ели аянской

Локус	Аллель	Морфотипы (число образцов)						
		I (24)	II (40)	III (41)	V (16)	VI (21)	VII (10)	IX (6)
Got-1	100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Got-2	100	0,542	0,488	0,598	0,500	0,476	0,500	0,417
	104	0,458	0,513	0,402	0,500	0,524	0,500	0,583
Lap-2	100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Skdh-1	80	0,354	0,438	0,341	0,438	0,357	0,400	0,417
	100	0,646	0,563	0,659	0,563	0,643	0,600	0,583
Mdh-1	91	0,083	0,063	0,061	0,188	0,119	0,050	0,000
	100	0,917	0,938	0,939	0,813	0,881	0,950	1,000
Mdh-2	100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Mdh-3	68	0,104	0,100	0,061	0,031	0,048	0,050	0,167
	100	0,896	0,900	0,939	0,969	0,952	0,950	0,833
Idh-2	55	0,271	0,238	0,256	0,156	0,238	0,150	0,167
	100	0,729	0,763	0,744	0,844	0,762	0,850	0,833
Sod-1	100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Sod-2	100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Gdh	100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Pgm-1	96	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	100	0,833	0,850	0,725	0,719	0,810	0,850	0,917
	108	0,146	0,150	0,275	0,281	0,190	0,150	0,083
Pgm-2	100	0,354	0,438	0,402	0,344	0,452	0,100	0,583
	105	0,646	0,563	0,598	0,656	0,548	0,900	0,417
Pgi-2	66	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	90	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000
	100	1,000	0,988	1,000	0,969	1,000	1,000	1,000
Hk	90	0,000	0,000	0,012	0,063	0,000	0,000	0,000
	100	0,958	0,975	0,963	0,906	0,952	1,000	1,000
	110	0,042	0,025	0,024	0,031	0,048	0,000	0,000

проанализированных изоферментных локусов. Из представленных в табл. 5 данных видно, что генетическое расстояние D между группами деревьев разных морфотипов варьирует в достаточно широком диапазоне значений: от 0,001 до 0,020. Самыми близкими по генетической структуре (D = 0,001–0,002) оказались морфотипы I, II, III и VI. Наиболее сильно отличаются по генетической структуре друг от друга (D = 0,020) морфотипы VII и IX. Различия между морфотипами по генетической структуре согласуются с их различиями по форме чешуй, количественным выражением которых служат Прокрустовы расстояния (табл. 5).

Корреляция между матрицами фенотипических и генетических расстояний, рассчитанная по ранговому коэффициенту корреляции Спирмена, составляет +0,40 (p = 0,01). Из этого следует, что чем сильнее различия деревьев ели по форме семенных чешуй шишек, тем больше вероятность генетических различий между ними.

Популяции различались по составу и частотам морфотипов. В каждой ценопопуляции представлено от 5 до 7 морфотипов по форме семенных чешуй шишек, при этом обычно доминируют 1–2 морфотипа. Отметим, что четыре из 12 морфотипов, в том числе 3 редких, встречаются только в северной группе выборок. Так, морфотип VII, генетически отличающийся от всех морфотипов по частотам аллелей локуса *Pgm-2*, обычен под вулканом Шивелуч (выборка E6) и отмечен под Ушковским вулканом (выборка E1), морфотип IV – во всех трех северных выборках (E1, E2 и E6), морфотип X – только в E1, морфотип XII – только в E2. Два морфотипа встречаются только в южной группе популяций: редкий морфотип XI – только в E4, а морфотип IX обычен только в E5 и не встречается в других популяциях. Эти фенотипические различия между южной и северной группами популяций,

Таблица 3. Результаты сравнения морфотипов ели аянской по частотам аллелей локусов *Pgm-2* и *Mdh-1*

Морфотипы	Локусы	Число аллелей	χ^2	df	*p*	Морфотипы	Локусы	Число аллелей	χ^2	df	*p*
I – II	*Mdh-1*	2	0,199	1	0,65	I–V	*Mdh-1*	2	1,905	1	0,177
	Pgm-2	2	0,864	1	0,35		*Pgm-2*	2	0,009	1	0,924
I – III	*Mdh-1*	2	0,235	1	0,63	I–VII	*Mdh-1*	2	0,230	1	0,631
	Pgm-2	2	0,298	1	0,585		***Pgm-2***	**2**	**4,530**	**1**	**0,033**
I – IX	*Mdh-1*	2	1,071	1	0,301	II–III	*Mdh-1*	2	0,002	1	0,968
	Pgm-2	2	2,101	1	0,147		*Pgm-2*	2	0,204	1	0,651
II – IX	*Mdh-1*	2	0,793	1	0,373	II–V	***Mdh-1***	**2**	**4,032**	**1**	**0,045**
	Pgm-2	2	0,894	1	0,344		*Pgm-2*	2	0,830	1	0,362
III – V	***Mdh-1***	**2**	**4,227**	**1**	**0,040**	II–VI	*Mdh-1*	2	1,170	1	0,279
	Pgm-2	2	0,335	1	0,563		*Pgm-2*	2	0,025	1	0,875
III – VI	*Mdh-1*	2	1,263	1	0,261	II–VII	*Mdh-1*	2	0,044	1	0,833
	Pgm-2	2	0,285	1	0,594		***Pgm-2***	**2**	**7,819**	**1**	**0,005**
III – VII	*Mdh-1*	2	0,035	1	0,852	V–VI	*Mdh-1*	2	0,672	1	0,412
	Pgm-2	**2**	**6,525**	**1**	**0,011**		*Pgm-2*	2	0,889	1	0,346
III – IX	*Mdh-1*	2	0,773	1	0,380	V–VII	*Mdh-1*	2	1,997	1	0,158
	Pgm-2	2	1,401	1	0,236		***Pgm-2***	**2**	**3,900**	**1**	**0,048**
VI – VII	*Mdh-1*	2	0,739	1	0,390	V–IX	*Mdh-1*	2	2,605	1	0,106
	Pgm-2	**2**	**7,511**	**1**	**0,006**		*Pgm-2*	2	2,072	1	0,150
VI – IX	*Mdh-1*	2	1,574	1	0,210	VII–IX	*Mdh-1*	2	0,619	1	0,431
	Pgm-2	2	0,641	1	0,423		***Pgm-2***	**2**	**8,667**	**1**	**0,003**

df – число степеней свободы, *p* – уровень значимости.

Таблица 4. Параметры генетической изменчивости основных морфотипов ели аянской, выделенных по форме семенных чешуй

Морфотипы (число образцов)	P, %	N_a	N_e	H_o	H_e	F
I (24)	53,3	1,600 ± 0,163	1,281 ± 0,095	0,156 ± 0,046	0,167 ± 0,051	0,022 ± 0,041
II (40)	60,0	1,600 ± 0,131	1,285 ± 0,102	0,177 ± 0,057	0,165 ± 0,052	–0,057 ± 0,019
III (41)	53,3	1,600 ± 0,163	1,286 ± 0,098	0,170 ± 0,054	0,166 ± 0,053	–0,031 ± 0,025
V (16)	60,0	1,667 ± 0,159	1,307 ± 0,098	0,183 ± 0,060	0,181 ± 0,052	0,022 ± 0,080
VI (21)	53,3	1,533 ± 0,133	1,287 ± 0,099	0,162 ± 0,052	0,168 ± 0,052	0,017 ± 0,055
VII (10)	46,7	1,467 ± 0,133	1,202 ± 0,086	0,120 ± 0,047	0,124 ± 0,045	0,024 ± 0,076
IX (6)	40,0	1,400 ± 0,131	1,252 ± 0,099	0,178 ± 0,079	0,144 ± 0,052	–0,125 ± 0,162
Среднее ± SE	52,4 ± 2,7	1,552 ± 0,054	1,272 ± 0,036	0,164 ± 0,021	0,159 ± 0,019	–0,015 ± 0,027

P – доля полиморфных локусов; N_a – среднее число аллелей на локус; N_e – эффективное число аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность; F – индекс фиксации Райта.

вероятно, могут быть следствием их генетической дифференциации в прошлом.

Показатели фенотипического и генетического разнообразия популяций приведены в табл. 6. Различия в генетическом разнообразии выборок в основном согласуются с различиями в их фенотипическом разнообразии по форме семенных чешуй. Наиболее высокий уровень генетической изменчивости и фенотипического разнообразия наблюдаются в самой южной из включенных в анализ ценопопуляций ели (E3), расположенных в подзоне слабых пеплопадов (табл. 6). Высокий уровень наблюдаемых гетерозиготности и фенотипического разнообразия отмечен и в другой выборке (E5) из этого района (табл. 6).

Самый низкий уровень и генетического, и фенотипического разнообразия отмечен в ценопопуляции ели с подножья вулкана Ушковский (E1), которая характеризует начальный этап формирования ельника на отложениях сухой речки. На заключительном этапе формирования

Таблица 5. Генетические расстояния D (Nei, 1972) и фенотипические (Прокрустовы) расстояния между изученными морфотипами ели аянской

Морфотипы	I	II	III	V	VI	VII	IX
I	0	0,044	0,024	0,065	0,024	0,040	0,057
II	0,002	0	0,040	0,032	0,059	0,079	0,086
III	0,002	0,003	0	0,052	0,045	0,046	0,078
V	0,005	0,005	0,004	0	0,085	0,097	0,114
VI	0,002	0,001	0,002	0,003	0	0,041	0,035
VII	0,007	0,010	0,010	0,008	0,011	0	0,063
IX	0,008	0,004	0,010	0,013	0,006	0,020	0

Белая часть – фенотипические расстояния, серая – генетические расстояния D по Nei.

Таблица 6. Параметры генетической изменчивости изученных ценопопуляций ели аянской и их разнообразие по форме семенных чешуй шишек

Выборка	P, %	N_a	N_e	H_o	H_e	F	μ ± Sμ
E1	46,67	1,467 ± 0,133	1,256 ± 0,094	0,147 ± 0,047	0,152 ± 0,050	–0,007 ± 0,034	3,621 ± 0,221
E2	53,33	1,600 ± 0,163	1,287 ± 0,100	0,147 ± 0,049	0,167 ± 0,052	0,093 ± 0,068	4,749 ± 0,199
E3	60,00	1,667 ± 0,159	1,298 ± 0,096	0,211 ± 0,068	0,176 ± 0,052	–0,132 ± 0,049	5,825 ± 0,202
E4	60,00	1,600 ± 0,131	1,248 ± 0,099	0,147 ± 0,052	0,143 ± 0,050	–0,044 ± 0,035	4,505 ± 0,273
E5	53,33	1,600 ± 0,163	1,278 ± 0,098	0,189 ± 0,064	0,163 ± 0,051	–0,101 ± 0,062	4,961 ± 0,080
E6	53,33	1,533 ± 0,133	1,283 ± 0,102	0,175 ± 0,060	0,162 ± 0,053	–0,048 ± 0,043	3,657 ± 0,395
Среднее	54,44	1,578 ± 0,059	1,275 ± 0,039	0,169 ± 0,023	0,161 ± 0,020	–0,043 ± 0,021	4,553 ± 0,836

P – **доля полиморфных локусов; N_a** – среднее число аллелей на локус; **N_e** – эффективное число аллелей; **H_o** – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность; **F – индекс фиксации Райта; μ** – индекс фенотипического разнообразия по частотам морфотипов, *S*μ – стандартная ошибка μ.

Таблица 7. Генетические расстояния D (Nei, 1972) и фенотипические расстояния между изученными ценопопуляциями ели аянской

Ценопопуляции	E1	E2	E3	E4	E5	E6
E1	0	0,608	0,581	0,701	0,631	0,709
E2	0,009	0	0,348	0,527	0,524	0,576
E3	0,005	0,013	0	0,421	0,455	0,623
E4	0,009	0,017	0,016	0	0,596	0,626
E5	0,005	0,012	0,008	0,005	0	0,538
E6	0,015	0,024	0,008	0,019	0,010	0

Белая часть – фенотипические расстояния, рассчитанные по составу и частоте морфотипов; серая – генетические расстояния D по **Nei.**

ельника в этих условиях (выборка E2) уровень фенотипического разнообразия выше среднего при среднем уровне генетического полиморфизма и дефиците гетерозиготных генотипов (табл. 6). Низкий уровень фенотипического разнообразия и средний уровень генетической изменчивости отмечены в выборке из ельника с подножья вулкана Шивелуч (E6), который испытывает катастрофическое вулканическое воздействие (табл. 6).

Генетические расстояния D (Nei, 1972) и фенотипические расстояния между изученными ценопопуляциями ели аянской, рассчитанные на основе показателя сходства популяций по составу и частоте морфотипов, приведены в табл. 7. Наибольшие фенотипические отличия от других популяций отмечены для двух выборок из северной группы с подножья вулканов Ушковский и Шивелуч (E1и E6). Выборка с вулкана Шивелуч (E6) наиболее сильно отличается от других популяций и по генетической структуре, в то время как выборка с Ушковского вулкана (E1) слабее дифференцирована от других исследованных ценопопуляций (табл. 7). Корреляция между генетическими и фенотипическими расстояниями популяций не выявлена.

Обсуждение

Отличия генетической и фенотипической структуры популяции ели аянской, произрастающей у подножья вулкана Шивелуч, объясняется сильным и длительным вулканическим воздействием. Только в голоцене для этого вулкана установлено не менее 60 крупных извержений, а в последние годы отмечается увеличение его активности и усиление интенсивности пеплопадов. В настоящее время ельники в этом районе находятся на стадии отмирания. Отмечено усыхание деревьев верхнего полога, снижается число деревьев второго яруса, сохранивших жизнеспособность. Вероятно, в этих условиях способность к семеношению сохраняют наиболее устойчивые к пеплопадам генотипы ели, что объясняет и отличия генетической структуры этой популяции, и снижение в ней фенотипического разнообразия деревьев по форме семенных чешуй шишек. Снижение и генетического, и фенотипического разнообразия, отмеченное на начальной стадии формирования ельника на отложениях сухой речки у подножья вулкана Ушковский, объясняется небольшой начальной численностью популяции и, вероятно, свидетельствует о том, что данная популяция происходит от небольшого числа родительских особей.

Ранее нами было установлено (Ветрова и др., 2014), что наиболее весомый вклад в межпопуляционную дифференциацию камчатских популяций ели аянской вносят локусы *Pgm-1* (Fst = 0,085) и *Idh-2* (Fst = 0,083). Слабые различия между морфотипами по этим локусам объясняют отсутствие связи между генетической и фенотипической дифференциацией популяций ели в проведенном исследовании.

Корреляция генетических и фенотипических расстояний между группами деревьев разных морфотипов согласуется с генетической детерминацией признака формы семенных чешуй у ели. Достоверные различия между морфотипами ели были выявлены по двум локусам: высокополиморфному локусу *Pgm-2* и среднеполиморфному локусу *Mdh-1*.

Данные о популяционной изменчивости ели аянской, полученные на основе молекулярно-генетического анализа, в целом согласуются с данными о фенотипическом разнообразии популяций по форме семенных чешуй шишек. Высокий уровень генетического и фенотипического разнообразия характеризует стабильную популяционную структуру ели аянской вне зоны влияния вулканов. Изменения в генетической структуре и низкий уровень фенотипического разнообразия наблюдаются в пессимальных условиях произрастания при катастрофическом вулканическом воздействии.

Использование геометрической морфометрии шишек позволило дифференцировать морфотипы ели и провести количественную оценку разнообразия и сходства популяций. Этот метод расширяет возможности фенотипического подхода к анализу структуры популяций и может быть рекомендован для других хвойных. В дальнейших исследованиях взаимоотношений между фенотипами и генотипами ели необходимо расширить набор ДНК- и фенотипических маркеров.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 11-04-00478-а).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М., 2003.

Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. М., 1984.

Ветрова В.П., Кравченко А.Н., Ларионова А.Я., Экарт А.К. Генетическая и фенотипическая изменчивость ели аянской (*Picea ajanensis*) в Центральной Камчатской депрессии. Вестн. СВНЦ ДВО РАН. 2014;3:95-105.

Ветрова В.П., Синельникова Н.В. Фенотипическая изменчивость и дифференциация популяций *Pinus pumila* (Pinaceae) на северо-востоке ареала. Ботан. журнал. 2014;99(7):771-785.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991.

Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений (на примере сем. Pinaceae на Урале). М., 1972.

Павлинов И.Я., Микешина Н.Г. Принципы и методы геометрической морфометрии. Журн. общ. биологии. 2002;63(6):473-493.

Попов П.П. Ель европейская и сибирская. Новосибирск, 2005.

Путенихин В.П., Шигапов З.Х., Фарукшина Г.Г. Ель сибирская на Южном Урале и в Башкирском Предуралье. М., 2005.

Санников С.Н., Петрова И.В. Дифференциация популяций сосны обыкновенной. Екатеринбург, 2003.

Санников С.Н., Петрова И.В. Феногеногеография популяций древесных растений: проблемы, методы и некоторые итоги. Хвойные бореальной зоны. 2007;24(2/3):288-296.

Фролов В.Д. Внутривидовой полиморфизм и структура популяций ели аянской на территории Сихотэ-Алиня: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1993.

Guries R.P., Ledig F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). Evolution. 1982;36:387-402.

Nei M. Genetic distance between populations. Amer. Nat. 1972;106: 283-292.

Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 2006;6:288-295.

Potenko V.V. Allozyme variation and phylogenetic relationships in *Picea jezoensis* (Pinaceae) populations of the Russian Far East. Biochemical Genetics. 2007;45(3/4):291-304.

Rohlf F.J. Programs tpsDig, version 2.16. 2010; available at http://life.bio.sunysb.edu/morph

Sheets H.D. Integrated Morphometrics Programs. 2001; available at http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html

Vetrova V.P. Geometric Morphometric Analysis of Shape Variation in the Cone-Scales of *Pinus pumila* (Pall.) Regel (Pinaceae) in Kamchatka. Botanica Pacifica. A Journa of Plant Science and Conservation. 2013;2(1):19-26.

Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. Geometric morphometrics for biologists: a primer. N.Y.: Elsevier Acad. Press, 2004.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):589-603
DOI 10.18699/VJ15.076

Селекция гибридных форм как стимул развития молекулярно-генетических исследований у ржи

Р. Шлегель

Прежнее место работы: Лейбниц-институт генетики растений и исследования культурных растений, Гатерслебен, Германия
Текущий адрес: Корренсштрассе 1, D-06466 Гатерслебен, Германия

Селекция ржи ведет свою историю начиная с 1850 г. с направленной селекции в семеноводческом хозяйстве Probsteier (Германия). Более чем 150-летний период селекции дал колоссальные результаты. Благодаря малому числу и небольшим размерам хромосом рожь долгое время была объектом цитологических исследований. Тем не менее вплоть до начала 1980-х годов информации в области генетических исследований ржи было не так уж много. Большие успехи были достигнуты только с развитием новых методов, таких как дифференциальное С-окрашивание, гибридизация *in situ*, белковые и молекулярные маркеры. Молекулярно-генетические исследования на ржи получили мощный импульс в значительной степени благодаря селекции гибридных форм ржи и успешному внедрению гибридных сортов в производство. Фундаментальные генетические знания, основанные на анализе внутри- и межвидового разнообразия и филогенетических отношений в роде *Secale*, в том числе с помощью ядерных и цитоплазматических ДНК-маркеров, способствовали успешному подбору родительских форм для скрещивания и тем самым внесли вклад в достижение высокого эффекта гетерозиса. Обсуждаются основные достижения гибридной селекции у ржи и генетические механизмы, используемые для реализации различных стратегий гибридной селекции. Перспективной стратегией маркер-контролируемого получения гибридных форм является перенос генов от местных стародавних сортов и диких видов ржи с помощью метода, сочетающего беккроссную селекцию с QTL-анализом и отбором по генотипу, или путем создания и использования так называемых библиотек интрогрессий. Маркер-контролируемый отбор и геномная селекция, основанные на полногеномных данных по маркерам, служат также для улучшения прогнозирования показателей получаемых гибридных форм. Результаты генетических исследований (в том числе картирования, филогенетических и популяционных исследований) рассматриваются в свете целей и задач гибридной селекции. К настоящему моменту в геноме картировано около 450 генов, контролирующих признаки и/или кодирующих известные белки, а также около 5 000 ДНК-маркеров. Они не только соотнесены с определенной хромосомой или участком генома, но и успешно используются для сравнительного картирования в эволюционных исследованиях, контролируемой передачи интрогрессий, маркирования QTL и маркер-ориентированной селекции.

Ключевые слова: растение; рожь; *Secale*; молекулярный маркер; генетическое картирование; физическое картирование; локус количественного признака; SNP; RFLP.

Hybrid breeding boosted molecular genetics in rye

R. Schlegel

Previous address: Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany
Current address: Corrensstrasse 1, D-06466 Gatersleben, Germany

History of rye (*Secale cereale* L.) breeding began from the first targeted selections made in Germany by the Probsteier Seed Cooperative around 1850, and over 150 years breeding yielded a tremendous amount of results. Rye has also long been used as cytological subject due to its low number of chromosomes and their size. However, genetic findings in rye up to the early 1980s were rather scant. About 120 genes could be assigned to seven linkage groups. Only through the development of new methods such as C-banding, *in situ* DNA hybridization, enzymology and molecular marker techniques achieved an enormous progress. Particularly, the latter was driven by agronomic success of hybrid breeding in rye. The basic genetic knowledge resulted from intra- and interspecies genetic diversity assay and phylogenetic studies in the genus *Secale* using nuclear and cytoplasmic molecular markers facilitated successful selection of parents for hybrid breeding and hence contributed to improvement of heterosis effects. Main achievements in rye hybrid breeding and genetic mechanisms exploited for different hybrid breeding strategies are discussed. The utilsation of landraces and wild relatives via advanced backcross procedures, combined by QTL analysis and introgression libraries, contributed to increase of heterotic effects. Those marker-assisted approaches became the basis of recent hybrid breeding of rye. Prediction of hybrid performance can also be improved significantly by marker-assisted selection and genomic selection based on genome-wide marker data. The findings in rye genetics (including phylogenetic, mapping and population studies) are reviewed in their relation with the hybrid breeding purposes and demands. Overall, about 450 morphological and biochemical traits are mapped throughout the genome plus about 5,000 DNA markers. They are not only associated with individual chromosome or segments but also efficiently used for comparative mapping (evolutionary studies),

УДК 633.14:575.162:575.22
Поступила в редакцию 18.04.2015 г.
Принята к публикации 18.08.2015 г.
© АВТОР, 2015

e-mail: rolf.schlegel@t-online.de

introgression monitoring, QTL tagging, and marker-assisted selection.

Key words: plant; rye; *Secale*; molecular marker; gene mapping; linkage studies; physical mapping; QTL; SNP; RFLP.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Шлегель Р. Селекция гибридных форм как стимул развития молекулярно-генетических исследований у ржи. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):589-603. DOI 10.18699/VJ15.076

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Schlegel R. Hybrid breeding boosted molecular genetics in rye. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5): 589-603. DOI 10.18699/VJ15.076

Развитие научных исследований на ржи, как и на других культурах, зависело от многих факторов. Исследования начались в конце 19-го столетия. На раннем этапе большое влияние на их развитие оказали идеи Чарльза Дарвина и его теория эволюции, в том числе положение о важности отбора.

Впервые направленный отбор ржи начал проводиться около 1850 г. в семеноводческом хозяйстве Probsteier, расположенном в с. Пробштай на севере Германии. Первым современным сортом с высокой устойчивостью к полеганию был Schlanstedter Roggen. Он был выведен В. Римпау (1842–1903), который начал заниматься селекцией озимой ржи в Шланштедте (Германия) в 1875 г. Наиболее успешными были сорта Ф. фон Лохова (1849–1924) из Петкуса (Германия), выведенные на основе генофонда Probsteier. Скрещивания, проводимые с 1880 г. в Биберице (возле Кённерна, Германия), дали начало сорту Bestehorn's Riesenroggen (автор Г. Бестехорн, 1836–1889). В Центральной России селекцию ржи начал проводить Н.В. Рудницкий (1877–1953) на станции Вятка около г. Кирова в 1894 г. Сорт Вятка все еще выращивается в сельскохозяйственных угодьях Северо-Западной России. Фридрих Георг Магнус фон Берг (1845–1938) вел селекцию ржи в хозяйстве Сангасте (Сагниц) в Эстонии. В 1875 г. была выведена местная популяция Sangaste, обладавшая зимостойкостью и крупнозерностью. В 1868 г. он начал подготовку исходного материала для селекции. Было проведено свыше 40 комбинаций скрещивания между несколькими сортами ржи. Первым был районирован сорт Probsteier. В настоящее время старейшей в мире культивируемой разновидностью ржи считается сорт Sangaste. На международной выставке, проходившей в Париже в 1889 г., рожь сорта Sangaste получила золотую медаль, а на выставке в Чикаго в 1893 г. – первый приз. Серебряные медали были присуждены этому сорту на всероссийской выставке в Харькове в 1888 г. и на Царскосельской юбилейной выставке в 1911 г.

Этот успех задал направление селекции, в котором применялись новые методы и генетические знания, а развитие исследований на ржи вступило во вторую стадию, продолжавшуюся около 100 лет. Этот этап начался с работ Ф. фон Лохова в Петкусе (Германия, к югу от Берлина). Начиная с 1882 г. он занимался селекцией ржи и вывел сорт Petkus. Вплоть до 1900 г. массовый отбор был стандартной методикой улучшения ржи, введенной немецким селекционером В. Римпау в Лангенштайне, где она отбиралась и выращивалась, по крайней мере, с 1732 г. Ф. фон Лохов независимо применил при селекции ржи предложенный Л. Вильмореном метод изолирования перекрестноопыляющихся культур. Этот метод поэтапно улучшался и привел к так называемому отбору по материнскому потомству, который в дальнейшем Ф. фон Лохов успешно применял больше 30 лет. Рекуррентный отбор с использованием многих модификаций, учитывающих последние открытия в генетике, стал обычной процедурой в селекции ржи. Хотя селекция гибридных форм ржи обсуждалась давно, их систематическое исследование началось в 1970 г. с открытия Р-цитоплазмы. Как и для многих культур, цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) стала краеугольным камнем в производстве гибридных семян.

Эта разработка ознаменовала третью стадию в селекции и генетике ржи и совпала с появлением молекулярных методов в генетике. Так, с начала 1990-х годов благодаря появлению новых методов и под влиянием селекции гибридных форм ржи и успешного внедрения их в производство началось бурное развитие молекулярно-генетических исследований на ржи.

Гетерозис и гибридные сорта

В 1877 г. К. Кляйнерт, немецкий садовод из Грушена (Шлихтингсхаузен, современная Польша), сообщил о получении гибридов между сортами ржи Swedish Snow Rye и Correns Rye. В полученных F_1 он обнаружил лучшее кущение и завязывание зерна по сравнению с популяцией ржи сорта Probsteier. Очевидно, Кляйнерт был первым, кто сообщил о гетерозисе у ржи, явлении, которое уже давно было известно у кукурузы и других культур (Rimpau, 1883). К наиболее ранним сообщениям о получении гибридных семян ржи относится также работа Ф. Фриммеля и Ф. Баранека, посвященная использованию в селекции ржи ксений (xenia; фенотипическое проявление признака отцовского растения в окраске, форме и величине семян – *прим. ред.*) (Frimmel, Baranek, 1935).

Для получения гибридных семян существовал цитогенетический подход: по аналогии с ячменем Дж. Де Фриз и Дж. Сибенга предложили использование так называемых телотретичных компенсирующих трисомиков (de Vries, Sybenga, 1989). Однако, как и в опытах с ячменем, дальше экспериментов дело не пошло.

Так же как у кукурузы, самоопыление перекрестноопыляющейся ржи приводит к сильной инбредной депрессии, а у гибридных генотипов наблюдается гетерозис. Особенно заметно гетерозис сказывается на урожае зерна. Продуктивность гибридов иногда достигает 210 % от среднеродительской величины. При дальнейшей гиб-

Таблица 1. Источники цитоплазматической мужской стерильности у ржи (*Secale* sp.)

Тип	Описание	Литературный источник
P	Цитоплазма ржи Pampa	Dohmen et al., 1994
V	Цитоплазма типа Vavilovii	Melz et al., 2001
C	Цитоплазма дикой ржи *Secale montanum*	Łapiński, 1972
R	Цитоплазма ржи	Кобылянский, Катерова, 1973
S	«Мутантная» цитоплазма ржи Kärtner	Warzecha, Salak-Warzecha, 2003
G*	«Мутантная» цитоплазма ржи Schlägler Alt и Norddeutscher Champagner	Melz et al., 2001, 2003

* Главный рецессивный ген, контролирующий мужскую стерильность, аллелен генам мужской стерильности типов C и R.

ридизации урожайность линий увеличивается, а эффект гетерозиса по отношению к среднеродительской величине снижается примерно до 140 %. Эти показатели сравнимы с таковыми у гибридных форм кукурузы и намного выше, чем у самоопыляющихся зерновых злаков, например, ячменя, пшеницы и риса, у которых величина среднеродительского гетерозиса составляет 5–10 % (Geiger, Miedaner, 1999). Кроме того, преимущество гибридной селекции наиболее заметно проявляется в достижении высоких показателей общей и специфичной комбинационной способности конечного сорта.

В соответствии с номенклатурой, применяемой к кукурузе, все гибридные сорта ржи, выведенные до сих пор, являются топкроссными гибридами (Schlegel, 2009), удовлетворяющими формуле $(A_{CMS} \times B) \times Syn_{Rf}$, где A_{CMS} – популяция A, несущая цитоплазматическую мужскую стерильность; B – популяция B; Syn_{Rf} – синтетик-восстановитель фертильности. То есть простой гибрид с ЦМС служит материнской родительской формой, а синтетик-восстановитель – вторым опылителем (Geiger, Miedaner, 2009). Такая материнская форма производится от одного или двух разных гетерогенных пулов, неродственных генному пулу опылителя. Из-за высокого уровня инбредной депрессии у ржи пока не удается получить простые гибриды, как у кукурузы или других зерновых.

Систематические исследования гибридов ржи начались в 1970 г. в Гогенгеймском университете в Германии с открытия так называемой P-цитоплазмы (Geiger, Schnell, 1970, см. табл. 1) в генотипе *Secale cereale* ssp. *tsitsinii* var. *multicaule*. Как и у многих зерновых, ЦМС стала основой для получения гибридной ржи. ЦМС можно было перенести в инбредные линии последовательным беккроссированием, получая фертильные линии с нормальной цитоплазмой или линии с мужской стерильностью и мутантной цитоплазмой при неизменном ядерном геноме.

Ф.В. Шнелль был первым, кто сообщил о цитоплазматической генетической мужской стерильности у ржи (Schnell, 1959). В линиях, полученных самоопылением европейских сортов ржи, он обнаружил многочисленное потомство со стерильной пыльцой. Наследование этого признака оказалось неясным (Кобылянский, 1969), однако более обширные опыты по скрещиванию ржи показали цитоплазматическое генетическое наследование мужской стерильности (Geiger, Schnell, 1970). Систематический отбор и генетические исследования, проводимые с 1966 г. в Гогенгеймском университете над 143 образцами ржи из Европы, Аргентины и Ирана, выявили образец с ЦМС из Аргентины, который был в дальнейшем обозначен как линия с P-цитоплазмой (см. табл. 1). Использование P-цитоплазмы стало важным компонентом программы по селекции ржи в Германии. P-цитоплазма ржи является аналогом так называемой «техасской» цитоплазмы, используемой для гибридной селекции у кукурузы.

Растения, неспособные к самовосстановлению фертильности, служащие для поддержания стерильности, найти не сложно, тогда как идеальные восстановители фертильности для P-цитоплазмы, напротив, довольно редки. С другой стороны, есть несколько других типов цитоплазм, которые при тестировании на мужскую стерильность в скрещиваниях с определенными опылителями ведут себя подобно P-цитоплазме, но не идентичны ей. Adolf, Neumann (1981) и Steinborn с коллегами (1993) обнаружили второй тип ЦМС цитоплазмы (см. табл. 1). По аналогии с P-типом он был назван «тип Vavilovii», или V-цитоплазма. Его трудно поддерживать, тогда как, в противоположность P-цитоплазме, для него легко найти восстановители. Недавно были идентифицированы шесть различных источников. Melz с коллегами (2001) описали еще один источник, G-цитоплазму, найденную в стародавних местных сортах Schlägler Alt и Norddeutscher Champagner (см. табл. 1).

В случае мужской стерильности, контролируемой ядерными генами, наблюдалось моногенное наследование. С использованием первичных трисомиков ржи сорта Esto ядерный ген *ms1* был локализован на хромосоме 4R. Модифицирующие гены, вероятно, замаскированные в нормальной цитоплазме, но экспрессирующиеся в цитоплазме, индуцирующей мужскую стерильность вместе с геном *ms1*, были локализованы на хромосомах 3R (*ms2*) и 6R (*ms3*). В потомстве от беккроссирования трисомиков были найдены моно-, ди- и тригенные типы наследования. Молекулярно-генетические исследования митохондриальной ДНК показывают близкое родство сорта Esto с генофондом немецкого сорта Pluto.

G-цитоплазма используется для расширения генетического разнообразия в селекции европейской ржи. С участием этого типа цитоплазмы уже получены два перспективных гибридных сорта: Hellvus (2007) с прочной соломиной и Helltop (2009) с крупным зерном, занимающие площадь 600 га по состоянию на 2012 г. (Melz, личное сообщение).

Гены-восстановители фертильности были обнаружены не только в экзотических образцах, но и в нескольких

европейских сортах. Частота гамет с генами-восстановителями в этих сортах варьировала от 10 до 20 %. За последнее десятилетие эти гены были картированы и подробно описаны (Glass et al., 1995; Dreyer et al., 1996; Geiger, Miedaner, 1996; Miedaner et al., 2000).

Ядерные гены мужской стерильности не получили практического применения для создания гибридных форм ржи. Несмотря на наличие у ржи всех необходимых компонент (*ms*-гены, подходящие маркеры и сбалансированные третичные трисомики с очень низким уровнем передачи по мужской линии) для использования системы, аналогичной системе BTT (balanced tertiary trisomics – сбалансированные третичные трисомики) ячменя (Ramage, 1965), у ржи так и не была реализована эффективная селекционная программа, основанная на применении данного метода (Sybenga, 1985).

Интрогрессия генов, обусловливающих ЦМС, и генов-восстановителей фертильности в новые гибридные родительские растения требует фундаментальных генетических знаний и сцепленных молекулярных маркеров, подходящих для направленного переноса данных генов. Чтобы улучшить материнское растение за счет новых признаков, требуются постоянные новые скрещивания и последующее беккроссирование, которые снова приводят к образованию линий с мужской стерильностью. Они несут в своем геноме гены, поддерживающие стерильность. Улучшение отцовского растения происходит сходным образом. Фундаментальные генетические знания, основанные на анализе внутри- и межвидового разнообразия и филогенетических отношений в роде *Secale*, в том числе с помощью ядерных и цитоплазматических ДНК-маркеров, способствуют успешному подбору родительских форм для скрещивания и потому также являются важной основой достижения максимального эффекта гетерозиса. В связи с этим направление работ по гетерозису стало своеобразным драйвером для разработки новых ДНК-маркеров, картирования ряда генов и развития популяционно-генетических и филогенетических исследований на ржи.

Филогенетические и популяционно-генетические исследования рода *Secale*

Селекция гибридных форм ржи основана на использовании цитоплазматической генетической мужской стерильности, которая, как правило, индуцируется за счет интрогрессии P-цитоплазмы аргентинской ржи, высокоустойчивой к факторам среды. Как показали Stojalowski с сотрудниками (2006), P-цитоплазма может быть идентифицирована с помощью полиморфных митохондриальных SCAR-маркеров (SCAR, sequence-characterized amplified region – последовательность, характеризующая амплифицированную область). Эти авторы протестировали 25 инбредных линий с помощью трех SCAR-маркеров. Анализ показал тесную связь между определяемыми с помощью маркеров митотипами и плазмотипами, представленными в растениях. Митохондриальные маркеры также подтвердили нормальный тип цитоплазмы (N-тип) у трех видов дикой ржи: *S. montanum*, *S. vavilovii* и *S. kuprijanovii*. Идентификация цитоплазмы у 186 растений свободно опылявшихся сортов турецкого и южноамериканского происхождения путем скрещивания их с двойным невосстанавливающим тестером, позволила выявить N-тип цитоплазмы у 77 растений, из них 63 подверглись дополнительной идентификации с помощью ПЦР-маркеров. Данные ПЦР полностью совпадали с генетическими данными, полученными на основе гибридологического анализа и фенотипической оценки. Митохондриальные маркеры также подтвердили наличие индуцирующей стерильность цитоплазмы в остальных 109 растениях. Кроме того, с помощью маркеров можно было различить растения, имеющие P- или V-тип цитоплазмы, а также удалось выявить широкую распространенность индуцирующей стерильность цитоплазмы, особенно в южноамериканских популяциях (Stojałowski et al., 2006).

Можно легко выделить две группы видов, важных для эволюции культурной ржи. Во-первых, это группа однолетних сорных трав, обычных на Ближнем Востоке, таких как *S. ancestrale*, *S. dighoricum*, *S. segetale* и *S. afghanicum*, которые цитологически сходны друг с другом и с культурной рожью (Schlegel, Weryszko, 1979). Их можно было бы включить как подвиды в вид *S. cereale*. Эта группа ограничена земледельческими районами. Сорные типы широко распространены в злаковых культурах в Иране, Афганистане и Закаспии (Zohary, 1971). Вторая группа – совокупность диких многолетних форм комплекса *montanum*, широко распространенных от Марокко по всему Средиземноморью и Анатолии и далее до Ирака и Ирана. Эта группа включает *S. ciliatoglumes*, *S dalmaticum* и *S. kuprijanovii.* Она разделена на отдельные виды, но более вероятно описать их как варианты одного вида, *S. montanum* (syn. *S. strictum*). Изолированная популяция этого вида также имеется в Южной Африке. Представители этой группы цитологически сходны и взаимофертильны. Однако они отличаются от комплекса *S. cereale* двумя большими реципрокными транслокациями, захватывающими три пары хромосом. Кроме того, на эволюцию ржи повлияли два однолетних вида, *S. vavilovii* и *S. silvestre*.

В последний раз таксономию ржи пересмотрели Frederiksen и Peterson (1998). Они выделили только три вида ржи: *S. silvestre*, *S. strictum* и *S. cereale*. *Secale strictum* имеет преимущество перед *S. montanum*. Он включает два подвида, а именно ssp. *strictum* и ssp. *africanum*. *Secale cereale* также включает два подвида. Это культивируемые таксоны, характеризующиеся крепким колосовым стержнем, как у ssp. *cereale*, и дикие или сорные таксоны с хрупким колосовым стержнем, как у ssp. *ancestrale*. По данным микросателлитных (SSR – simple sequences repeats, простые повторяющиеся последовательности) маркеров, средний уровень полиморфизма между видами выше, чем внутри *S. cereale*. Средний индекс генетического сходства (GS – genetic similarity) в роде *Secale* ниже, чем у культивируемой ржи. Наибольший внутривидовой GS в роде *Secale* наблюдался у *S. silvestre*, а наименьший – у *S. strictum*, тогда как наибольший межвидовой GS был найден между *S. cereale* и *S. vavilovii*, а наименьший – между *S. silvestre* и *S. cereale*. Среди образцов культивируемой ржи из Азии, Европы, Северной и Южной Америки не было обнаружено очевидных различий в уровнях индекса генетического сходства. По данным генотипирования,

американские сорта более родственны китайским, чем европейским, возможно, вследствие обособления последних в результате приспособления к местным условиям. Дальнейшие исследования китайских сортов с помощью RAPD-маркеров (random amplified polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК) выявили достаточно большие генетические расстояния. Возможно, такие существенные различия обусловлены культивированием ржи в географически изолированных районах Китая и отсутствием обмена генетическим материалом между данными районами. Поэтому генетический дрейф породил независимые подгруппы китайских сортов.

Между *S. cereale* и *S. vavilovii* не было найдено очевидных различий, на основании которых последний можно было бы считать видом. Это было показано с применением доминантных RAPD- и ISSR-маркеров (inter simple sequence repeats – межмикросателлитные последовательности) (Santos et al., 2015). Подвид *segetale*, представляющий промежуточную форму между *S. cereale* и *S. strictum*, по-видимому, является непосредственным предшественником культурной ржи. Однако в этой работе была подтверждена гетерогенность многолетних форм. На основе анализа кодирующей последовательности гена *ScMATE1* выявлен высокий уровень генетического разнообразия внутри рода *Secale*, а сделанные филогенетические построения согласуются с таковыми, полученными с использованием доминантных маркеров. Кроме того, показано несоответствие *S. vavilovii* отдельному виду, что согласуется с пересмотром рода *Secale*, проведенным в работе Frederiksen и Peterson (1998), которые не признавали *S. vavilovii* в качестве самостоятельного вида, но выделяли в отдельные виды *S. cereale* и *S. strictum*.

Кластерный анализ показал, что все формы *Secale* можно различать по 24 микросателлитным локусам (Shang et al., 2006). Образцы *S. silvestre*, очевидно, отличаются от образцов других видов, а образцы *S. vavilovii* близки к образцам *S. cereale*. *Secale strictum* был гетерогенен и показал большие внутривидовые различия. Дендрограммы, построенные на основе данных по микросателлитным (Shang et al., 2006) и AFLP-маркерам (amplified fragment length polymorphism – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов) (Chikmawati et al., 2005; рис. 1), надежно показывают филогенетические отношения между видами *Secale*, но не отражают возможный процесс доместикации культивируемой ржи на основе географии образцов. Сравнение изменений в хлоропластной ДНК (хлДНК) подтвердило, что *S. silvestre* значительно отличается от остальных таксонов. Это базовое отличие *S. silvestre* от *S. montanum* и/или *S. strictum* возникло в плиоценовую эпоху или позже.

Маркерные технологии на основе микрочипов, как, например, DArT (diversity arrays technology – ДНК-чип технология для изучения разнообразия) или SNP (single-nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм), в частности SNP-чип ржи «Rye5K-SNP Genotyping Array» (Haseneyer et al., 2011), хорошо подходят не только для картирования генов, но и для популяционных исследований. Bolibok-Bragoszewska с коллегами (2009) получили DArT-маркеры на основе свыше 1 022 клонов, полиморфные в генотипированных изогенных линиях

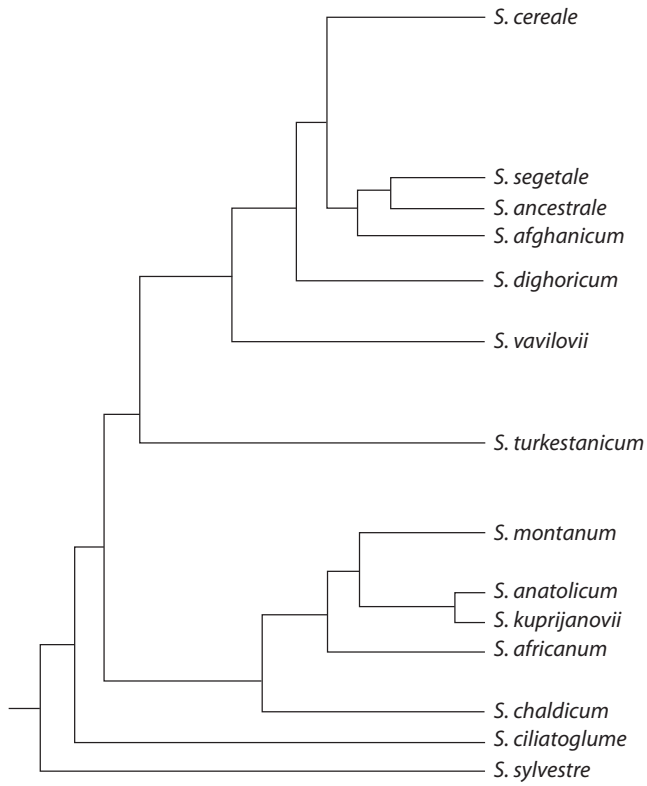


Рис. 1. Филогенетические отношения в роде *Secale* L. согласно данным AFLP и RFLP анализа (по: Chikmawati et al., 2006 с изменениями).

и сортах, и на основе 1 965 клонов, которые различались в родительских линиях L318 и L9. С помощью кластерного анализа на основе данных, полученных с помощью 1 022 упомянутых DArT-маркеров, было изучено генетическое сходство в коллекции сортов и инбредных линий. С использованием пшенично-ржаных дополненных линий на хромосомах ржи были локализованы 1 872 DArT-маркера, на молекулярно-генетическую карту L318 / L9 со средней плотностью один маркер на 2,7 cM были нанесены 1 818 DArT-маркеров. Таким образом, впервые построена молекулярно-генетическая карта ржи столь высокой плотности, причем исключительно на основе маркеров, допускающих перекрестное применение у разных видов. Изучение генетических отношений среди сортов и генетических расстояний между инбредными линиями с помощью DArT-маркеров существенно облегчает дальнейший подбор пар для скрещивания. Коэффициенты генетического сходства для всех 600 возможных пар генотипов, вычисленные на основе коэффициента Жаккара, варьировали от 0,3 в паре инбредных линий Ot1-3 до 1,0 в каждой паре сорта Dańkowskie Złote (рис. 2). Эти методические разработки позволяют более эффективно выявлять различия в гетерозиготных популяциях и тем самым лучше подбирать пары для скрещивания.

Маркер-контролируемое создание и использование интрогрессивных линий

Несмотря на некоторые трудности, связанные с интрогрессией чужеродного генетического материала в перс-

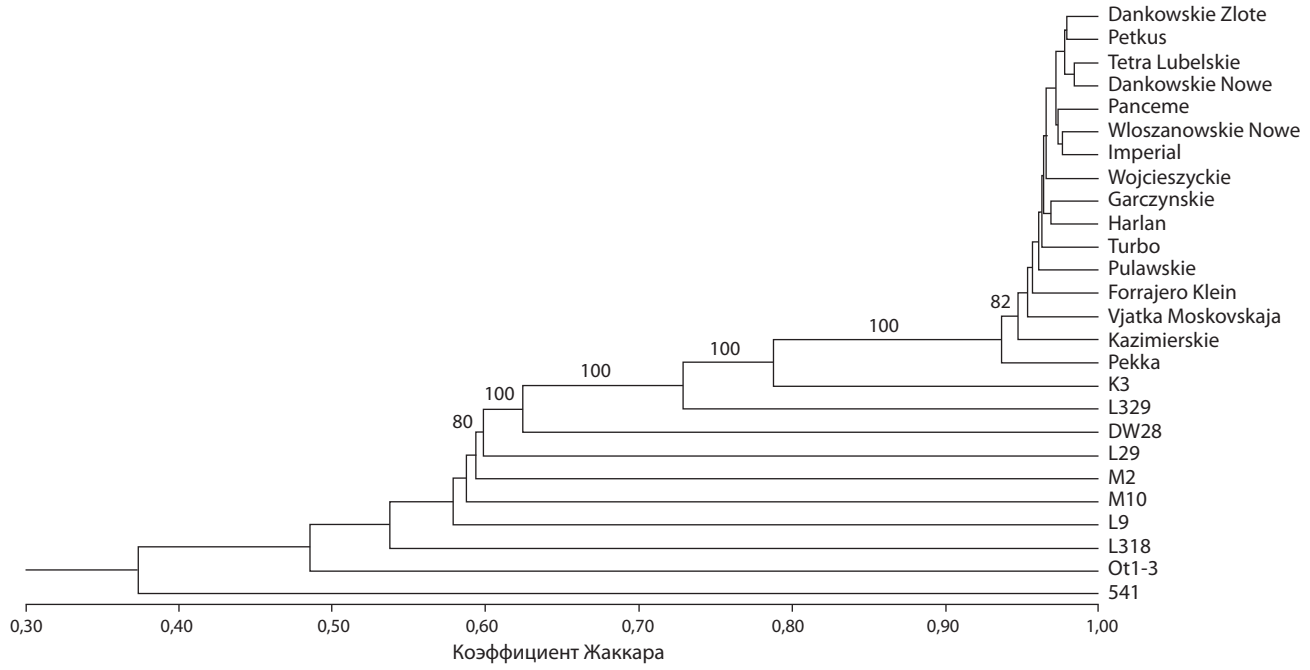


Рис. 2. Дендрограмма, построенная методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) на основе матрицы сходства Жаккара для данных, полученных путем анализа сортов и инбредных линий ржи с помощью 1 022 DArT маркеров (по: Bolibok-Brągoszewska et al., 2009).

пективный селекционный материал, при многих селекционных стратегиях данные о местных сортах или диких видах полезны для улучшения признаков, имеющих олигогенный или полигенный контроль. При этом передача генетического материала из родственных генофондов может осуществляться по следующим схемам: за счет метода, сочетающего беккроссную селекцию с QTL-анализом (QTL – quantative trait loci, локусы количественных признаков) и отбором по генотипу (advanced backcross QTL-analysis), или путем создания и использования так называемых библиотек интрогрессий, т. е. наборов линий ржи с единичными интрогрессиями, маркированных молекулярными маркерами. Передача данных интрогрессий от линий-доноров реципиентам (элитный селекционный материал) контролируется методами молекулярного анализа.

В настоящее время путем маркер-контролируемого отбора (при использовании AFLP- и SSR-маркеров) создано, по крайней мере, три библиотеки интрогрессивных линий, например библиотека, при получении которой в качестве донора использовалась стародавняя иранская рожь Altevogt 14160. Работы с библиотеками нацелены на выявление перспективных интрогрессивных линий, превосходящих рекуррентного родителя по различным показателям, и на идентификацию участков хромосом, ответственных за улучшенные характеристики. Библиотеки покрывают около 70 % всего генома донора. Фенотипическая оценка упомянутой библиотеки интрогрессивных линий ржи уже выявила значительную генетическую изменчивость в отношении количественно наследуемых признаков, таких как хлебопекарное качество и восстановление фертильности пыльцы (Falke et al., 2008, 2009; Geiger, Miedaner, 2009).

Участки хромосомы донора (иранской ржи) были введены в генетическое окружение элитной инбредной линии L2053-N (рекуррентный родитель) путем беккроссирования с маркер-контролируемым отбором. Гибридное потомство оценивали по урожайности, высоте растений, а также по показателям качества в течение двух лет в пяти географических точках, с несколькими повторными полевыми экспериментами, при использовании двух тестеров в каждой точке. Средние показатели гибридов, полученных от интрогрессивных линий, были сравнимы с таковыми от рекуррентного родителя. Однако сравнение каждой линии с родительской формой позволило выявить значимые различия между отдельными перспективными интрогрессивными линиями и рекуррентным родителем по большинству признаков. Среди этих значимых различий в 60 % случаев перспективные интрогрессивные линии превосходили рекуррентного родителя. Для некоторых линий были идентифицированы определенные участки донорских хромосом, предположительно содержащие QTL, ответственные за лучшие показатели гибридов (Mahone et al., 2013).

Это исследование показало, что получение и использование библиотек интрогрессивных линий дает возможность целенаправленно повышать генетическое разнообразие элитного материала в селекции ржи и улучшать показатели получаемых гибридов или популяций. Кроме того, точная локализация ответственных за улучшение показателей участков донорской хромосомы дает возможность подробно анализировать плейотропные эффекты и изучать соответствие между эффектами как *per se*, так и в тестовых скрещиваниях. Во многих случаях анализ линейной модели позволяет соотнести эффекты донора

с определенными участками донорской хромосомы даже для интрогрессивных линий с длинными или множественными донорскими участками. Возможно, это значительно увеличит эффективность получения субинтрогрессивных линий, потому что нужно выделять только такие участки, которые заведомо оказывают значительное влияние на фенотип (Mahone et al., 2013).

Таким образом, получение и использование интрогрессивных линий, сопровождаемые маркер-контролируемым отбором, могут способствовать расширению генетического разнообразия селекционного материала ржи. При этом культивируются лишь некоторые представители рода *Secale,* тогда как большая часть их является ценным генетическим ресурсом для селекции. Рожь проявляет широкий диапазон генетического разнообразия, основанный на больших экологических различиях между регионами возделывания и центром происхождения. Внутрисортовая изменчивость иногда превышает межсортовую. В различных странах имеются обширные коллекции, содержащие местные сорта из Европы, Азии и Южной Америки, исходные популяции с Ближнего Востока и дикие виды рода *Secale.* Эта всемирная коллекция представлена 22 200 образцами в 94 генных банках.

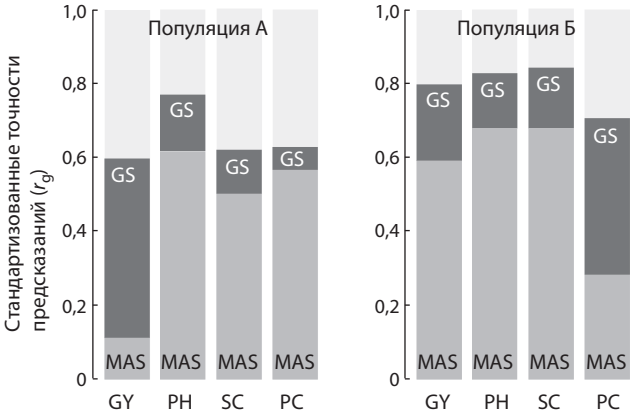


Рис. 3. Перекрестно проверенные стандартизованные точности предсказаний (r_g) для геномной селекции (темно-серый) в сравнении с маркер-контролируемым отбором (светло-серый).

Геномная селекция осуществлялась при использовании статистической модели rrBLUP. Маркер-контролируемый отбор проводился на основе QTL с пороговым значением 3,73. Даны результаты перекрестной проверки для четырех стандартных признаков (выход зерна, GY; высота растения, PH; содержание крахмала, SC; содержание пентоз, PC) по двум различным популяциям (по: Wang et al., 2014 с изменениями).

Прогнозирование показателей гибридных форм

Важнейшей составляющей селекционной работы является правильное прогнозирование изменения показателей в результате отбора. Оно начинается с простых наблюдений. Флаговый лист ржи меньше по размеру, чем у пшеницы, и менее значим для фотосинтеза. Размер второго сверху листа равен или близок размеру усредненного листа и потому может использоваться для оценки общей биомассы листвы растения. Длинные и узкие листья типичны для более засухоустойчивых сортов, а короткие и широкие листья характеры для относительно позднеспелых, подверженных поражению мучнистой росой растений с низкой урожайностью.

Генотипическая корреляция между продуктивностью линии и ее тестовых гибридов является важным количественным генетическим параметром для оптимизации селекционных программ. Для изучения связи продуктивности линии и ее тестовых гибридов на фенотипическом уровне Miedaner с коллегами (2014) проанализировали две расщепляющиеся популяции озимой ржи (А и Б, 220 гибридов в каждой) по восьми признакам, связанным с урожайностью и качеством, в шести эколого-географических районах и показали, что генотипическая варианса и коэффициент наследуемости для линий превышают соответствующие показатели для тестовых гибридов по всем изученным признакам. Как следует из соответствующих коэффициентов наследуемости, генотипическая корреляции (r_g) между показателями тестовых гибридов и самой линии тем меньше, чем сложнее признак. Наиболее высокая корреляция ($r_g \geq 0{,}7$) наблюдалась в популяции Б по высоте растений и контрольной массе и в обеих популяциях – по признакам «масса 1 000 зерен» и «число падения», а также по содержанию крахмала. Таким образом, по этим признакам можно проводить отбор в ранних поколениях на основе показателей самих линий и тем самым сэкономить посевные площади при дальнейшем анализе гибридов, а следовательно, повысить эффективность гибридной селекции.

Маркер-контролируемый отбор, а также геномная селекция, основанная на полногеномных данных о маркерах, являются наилучшими инструментами для предсказания генотипической ценности популяций ржи в селекции гибридов. В настоящее время широко применяется маркер-контролируемый отбор, но он не всегда является оптимальным в случае сложных агрономических признаков, так как обычно основывается на предсказаниях, сделанных на основе небольшого числа маркеров, находящихся в неравновесном сцеплении с QTL, оказывающими большой эффект, и, таким образом, не учитывает QTL, вносящие небольшой и средний вклад в формирование признака. При проведении геномной селекции с перекрестной проверкой при использовании статистической модели rrBLUP (Whittaker et al., 2000) Wang с коллегами (2014) добились стабильно высокой стандартизованной точности предсказаний в обеих популяциях по всем изучаемым признакам (рис. 3): в популяции А точность предсказания выхода зерна при геномной селекции составила 0,6 (для сравнения, при маркер-контролируемом отборе точность предсказания по этому признаку составила 0,1), в популяции Б (по содержанию пентоз) – 0,7 (при маркер-контролируемом отборе – 0,3).

Для достижения высокой точности предсказания в геномной селекции используется большое число молекулярных маркеров, равномерно распределенных по всему геному. В отличие от маркер-ориентированной, геномная селекция позволяет вести отбор по локусам с малыми эффектами и потому использовать в селекционном процессе все генетическое разнообразие анализируемой популяции. В селекции гибридной ржи использование методов геномной селекции предпочтительнее маркер-контролируемого отбора, точность предсказаний которого, даже будучи

Таблица 2. Подборка генетических исследований ржи (*Secale cereale*), показавшей расщепление 3 : 1 в F_2 (по: Roemer, Rudorf, 1950 с изменениями)

Признак	Аллель		Литературный источник
	доминантный	рецессивный	
Цвет зерна	Зеленый	Желтый	Rümker, Leidner, 1914
	Черный	Желтый	Steglich, Pieper, 1922
Цвет колеоптиля	Красный	Зеленый	Treboux, 1925
Цвет проростка	Зеленый	Белый	Nilsson-Ehle, 1913
	Зеленый	Бело-зеленый	Brewbaker, 1926
	Зеленый	Золотисто-пестрый	Brewbaker, 1926
Тип листа	Восковой	Безвосковой	Nilsson-Ehle, 1928
Лигула	Есть	Нет	Krasnyuk, 1936
Соломина	Опушенная	Неопушенная	Tschermak, 1906
	Нормальная	Хрупкая	Brewbaker, 1926
Ось колоса	Хрупкая	Твердая	Tschermak, 1906
Колосковая чешуя	Зеленая	Белая	Sirks, 1929
Цвет колосковой чешуи	Бурая	Желтая	Berkner, Meyer, 1927
Фертильность	Самостерильность	Самофертильность	Heribert-Nilsson, 1916
	Самофертильность	Самостерильность	Peterson, 1934
Озерненность	Нормальная	Неравномерная	Pamme, 1905
Срок созревания	Ранний	Поздний	Tschermak, 1906
Тип развития	Яровой	Озимый	Tschermak, 1906

потенциально завышенной, все равно ниже, чем при геномной селекции (Wang et al., 2014). Однако высокая точность предсказаний в геномной селекции достигается только для кандидатов, близкородственных растительному материалу, оцениваемому в полевых опытах. Тем не менее геномная селекция приобретает все большее значение для будущих эффективных и экономичных селекционных проектов. К тому же данный подход может быть усовершенствован с помощью недавно разработанного ансамблевого метода «соответствия мягкому правилу» (soft rule fit), который позволяет учитывать нелинейные ответы QTL на стрессовые воздействия (Heslot et al., 2014). Определение взаимодействия генотипа и среды (G × E) – одна из основных задач при анализе фенотипов. Необходимость учета средовых данных для моделирования взаимодействия генотипа и среды рассматривалась давно, но при этом возникали те же проблемы, что и сейчас стоят при проведении геномной селекции – большое число коррелированных предикторов, каждый из которых отвечает за малую долю общей изменчивости. Дополнительную трудность создают нелинейные ответы генотипов на стрессовые воздействия. Для выведения относящихся к стрессу независимых переменных из посуточных данных о погоде с целью предсказания стадий развития растения в геномной селекции можно использовать факториальную модель регрессии. При этом в отсутствие наблюдений за счет погодных данных точность предсказания характеристик генотипа может быть увеличена в среднем на 10 % и до такой же степени может быть снижена изменчивость в точности предсказания (Heslot et al., 2014).

Основные достижения в области генетики ржи

Генетическое исследование ржи затруднительно из-за перекрестного типа опыления. Первые публикации о моногенных признаках у ржи сведены в табл. 2. Полигенное наследование давно наблюдалось для признака «длина соломины», причем длинный стебель преобладал над коротким; для формы зерна с преобладанием длинных зерен над короткими; для формы колоса с преобладанием длинного над коротким, широкого над узким и плотного над рыхлым, а также поникшего над прямым или с преобладанием многолетнего типа развития над однолетним соответственно (Tschermak, 1906). Несмотря на перекрестный тип опыления, рецессивные признаки (альбинизм, безвосковость и т. д.) появляются с низкой частотой (0,01–0,02 %) как нетипичные даже в сортах-популяциях (Roemer, Rudorf, 1950). Со времени первого описания мутанта с разветвленными колосьями в 1757 г. генетика ржи прошла большой путь. Так что можно считать, что генетические исследования ржи длятся свыше 250 лет.

Изучение пшенично-ржаных транслокаций и замещений способствовало развитию генетики ржи

С момента выхода самых ранних сообщений о спонтанных замещениях хромосом пшеницы хромосомами

ржи (Katterman, 1937; O'Mara, 1947; Riley, Chapman, 1970: замещение 5R(5A) с маркирующим признаком ржи «опушенная колосоножка») и до появления недавней работы о локализации ряда QTL в области транслокации 1RS.1BL (Tahmasebi et al., 2015: QTL для признаков «масса 1 000 зерен», «число колосков в колосе», «плотность колоса», «длина остей») замещения и транслокации ржи были многократно описаны в мировой коллекции сортов пшеницы. В частности, известны более 400 сортов мягкой пшеницы с замещением 1R(1B) или транслокацией 1RS.1BL (Schlegel, 2015). Характерными для таких сортов являются устойчивость к широкому спектру рас возбудителей мучнистой росы и ржавчин (Bartos, Bares, 1971; Zeller, 1973), хорошие экологическая приспосабливаемость, урожайность (Rajaram et al., 1983; Tahmasebi et al., 2015) и сниженное хлебопекарное качество (Zeller et al., 1982).

В начале 1970-х годов один из выдающихся селекционеров пшеницы, П.П. Лукьяненко, описал влияние транслокации 1RS.1BL на фертильность колоска (Лукьяненко, 1973). Затем это наблюдение подтвердили Schlegel, Meinel (1994) при сравнении гибридов, отличающихся по наличию/отсутствию фрагментов хромосомы 1R сорта ржи Petkus (Schlegel, Korzun, 1997). Руководствуясь методом исследования количественных признаков у животных (Geldermann, 1975), Р. Шлегель и А. Майнель (Schlegel, Meinel, 1994) впервые осуществили QTL-анализ у ржи как раз на примере признака «фертильность колоска» (*Spf*, spikelet fertility), определили физическое местоположение локуса (*Spf1*) в коротком плече хромосомы 1R и оценили его вклад в изменчивость этого признака (17 и 23 %), продемонстрировав тем самым влияние генетического фона пшеницы на экспрессию *Spf1* ржи. Таким образом, работы, связанные с изучением влияния транслокаций и хромосомных замещений ржи в геноме пшеницы, внесли существенный вклад в исследование генов ржи.

Физическое картирование

Транслокации. Цитогенетические, цитологические или генные карты отображают расположение генных локусов по отношению к концам хромосомы, центромере или определенным участкам хромосомы. Как и у других видов растений, локализация генов у ржи – весьма непростая задача. Дж. Сибенга с коллегами из университета Вагенингена (Нидерланды) выполнили первые исследования по физическому картированию с использованием реципрокных хромосомных транслокаций. Был получен набор транслокационных тестеров ржи, охватывающий все семь хромосом, путем обмена между хромосомами 1RS-4RL, 1RS-5RL, 1RS-6RS, 2RS-5RS, 2RL-6RL, 3RS-5RL, 4RL-5RL и 5RL-7RS. Эти линии были получены при облучении пыльцевых зерен ржи сорта Petkus, скрещенного с несколькими инбредными линиями (de Vries, Sybenga, 1984). Эти тестеры дали возможность хромосомной локализации 17 моногенно наследуемых морфологических маркеров.

Гибридизация ДНК *in situ*. Позднее Gustafson с коллегами (1990) использовали последовательность длиной 900 п. н. из кДНК гена *Sec1*, кодирующего запасной белок эндосперма, для мечения биотином и гибридизации с хромосомами ржи Blanco. Примерно в 8,5 % проанализированных клеток в сателлитной части короткого плеча хромосомы 1R, где был генетически картирован ген *Sec1*, наблюдался гибридизационный сигнал. С меньшей частотой эта проба также гибридизовалась на хромосомные плечи 1RL (4,4 %) и 2RS (2,6 %). Таким образом были выявлены еще два локуса запасных белков ржи, *Sec3* и *Sec2*. Четвертый сайт гибридизации был зафиксирован на коротком плече хромосомы 6R с частотой 3 %.

Благодаря комбинации цитогенетических и молекулярных подходов, в определенном концевом участке хромосомы 5RL удалось картировать ряд локусов, контролирующих морфологические, биохимические и физиологические признаки (рис. 4). За счет обмена концевыми участками между хромосомами 5RL ржи и 4BL пшеницы были выявлены несколько генов и маркерных локусов, ассоциированных с хромосомным участком 5RL2.3 у ржи (Schlegel et al., 1993).

Делеции. Dundas с сотрудниками (2001) для физического картирования генов использовали не транслокации, а делеции. Известно, что паразитические нематоды образуют цисты у злаков. Так, *Heterodera avenae* повреждает листья и стебли, *Ditylenchus dipsaci* вызывает галлы на корнях, *Subanguina radicicola* – корневые наросты, *Meloidogyne* sp. – галлы на семенах. Существуют гены, которые придают устойчивость к нематодам. В потомстве пшенично-ржаных делеционных линий идентифицированы четыре делеционных мутанта по хромосоме 6R ржи. Эта хромосома несет ген устойчивости к нематоде *Heterodera avenae*, вызывающей образование злаковых цист. Ген происходит от гексаплоидной линии тритикале «Т701». Делеционные мутанты были отобраны на основе изменений, выявленных в трех изоферментных локусах на длинном плече хромосомы 6 ржи. Три растения и их потомство показали экспрессию генов ржи *α-Amy-R1* и *Got-R2*, но не *Pgd-R2*. Другое растение и его потомство показали экспрессию гена *α-Amy-R1*, тогда как гены *Got-R2* и *Pgd-R2* не выявлялись. В четырех случаях наблюдались различные по размеру концевые делеции длинного плеча, что позволило физически картировать изоферментные локусы ржи и ген устойчивости к нематоде. Порядок расположения изоферментных локусов хромосомы 6R от дистального до проксимального был следующим: *PgdR2 – Got-R2 – α-Amy-R1*. Биологические тесты на устойчивость показали, что ген устойчивости *Cre-R* расположен в участке длинного плеча хромосомы 6R вблизи локуса *Got-R2*.

Mohan с коллегами (2007) физически картировали 182 EST–SSR маркера ржи на 21-й хромосоме пшеницы также с помощью делеций хромосом. В исследовании использовали два подхода: экспериментальный с применением делеционных линий и компьютерный, включающий сравнение с ранее картированными маркерными экспрессирующимися последовательностями (expressed sequence tags, EST). Было показано, что значительная доля (около 77 %) изученных EST–SSR маркеров ржи могут быть использованы для анализа генома пшеницы. Поиск гомологов в базе данных белковых последовательностей позволил сделать предположения о функциях 216 SSR-содержащих EST последовательностей.

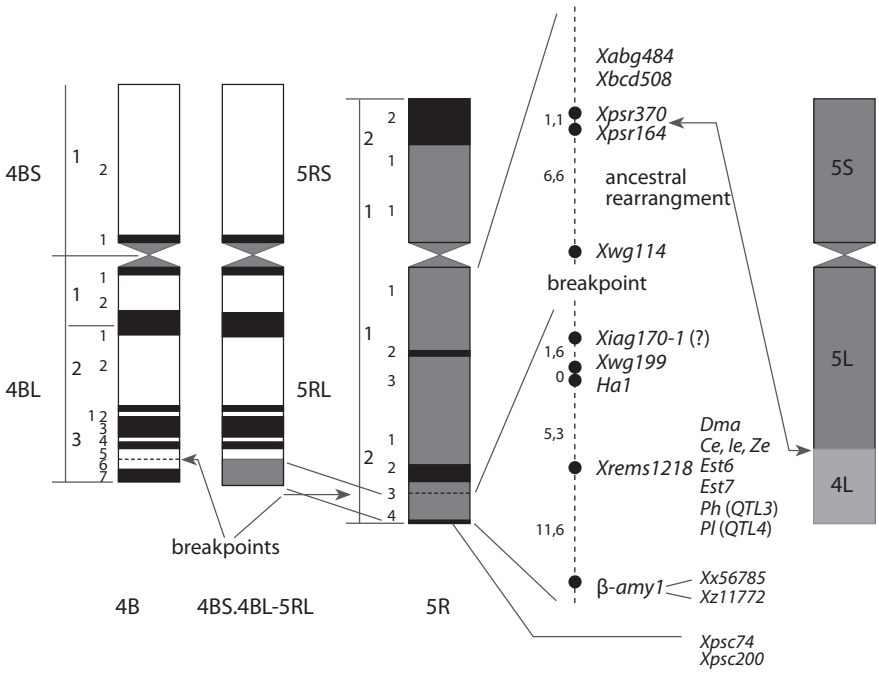


Рис. 4. Схематическое изображение хромосом пшеницы и ржи и/или участков, вовлеченных в транслокации 4B/5R между сортами Cornell Selection и Viking-Trans, с указанием порядка и наименования генов, содержащихся в транслоцированном участке (по: Schlegel et al., 1993 с изменениями).

4BS – короткое плечо хромосомы 4B пшеницы, 4BL – длинное плечо хромосомы 4B пшеницы, 5RS – короткое плечо хромосомы 5R ржи, 5RL – длинное плечо хромосомы 5R ржи, 5S – короткое плечо гомологичной хромосомы 5, 5L – длинное плечо гомологичной хромосомы 5, 4L – длинное плечо гомологичной хромосомы 4. Числа вдоль хромосом обозначают индивидуальные области в каталоге Shlegel, Korzun (2015). Пунктирные линии на хромосомах 4B и 5R показывают предполагаемое положение точек разрыва (breakpoint) при транслокации. Четвертая слева схема показывает участок гена и/или порядок маркеров, включая расстояния между локусами, напр.: *X* – молекулярные маркеры, *Ha1* – опушенная колосоножка, *Dma* – синтетаза дезоксимугеиновой кислоты, *Ce*, *Ie*, *Ze* – способность к росту при дефиците меди, железа и цинка соответственно, *Est*… – эстераза, *Ph* – высота растения, *Pl* – длина растения, β-*amy*… – бета-амилаза. Ancestral rearrangment – транслокация между предковыми хромосомами 4 и 5 до эволюционного расхождения пшеницы и ржи.

Локусы количественных признаков

Количественная генетика, иногда называемая биометрической или статистической генетикой, занимается изучением наследования количественных признаков, зависящих от совокупного действия многих генов, каждый из которых производит малое действие. Признак демонстрирует непрерывную изменчивость, т. е. плавно варьирует от одного крайнего значения к другому. Таким образом, количественные признаки – это те, в которых изменчивость непрерывна, и ее классификация на дискретные категории произвольна.

Большинство агрономически важных признаков ржи являются полигенными, или количественными. В противоположность качественно наследуемым генам, поиск и описание локусов количественных признаков (QTL) затруднены. Первые косвенные данные о QTL у ржи приводятся в работе Лукьяненко (1973), где он описал немецкий сорт пшеницы Нойцухт (донор 1RS.1BL пшенично-ржаной транслокации для сортов пшеницы Аврора и Кавказ), в котором фертильность колосков была значительно повышена. Это подтвердили Schlegel, Meinel (1994). Связь увеличенной плодовитости колоска у пшеницы с наличием короткого плеча хромосомы 1R ржи была подтверждена выявлением QTL на 1RS, обозначенного «*Spf1*» (spikelet fertility). Локус *Spf1* отвечал за 20 % изменчивости признака.

Технологии молекулярных маркеров и создание насыщенных генетических карт ржи создали предпосылки для более обширных исследований QTL. В настоящее время имеется 5 400 маркеров, включая изоферменты, RFLP (restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов), RAPD, SSR и AFLP, для маркирования количественных признаков. Этот набор маркеров позволяет создавать карты сцепления для дальнейшего выявления локусов количественных признаков, связанных с характеристиками корня, соломины, колоса, с физиологическими и биохимическими характеристиками, а также с устойчивостью (табл. 3).

Количественные признаки, определяющие морфологические свойства и урожайность, были проанализированы с использованием данных RFLP-анализа 275 растений F_2 (Börner et al., 2000). Первая составленная карта содержала 113 маркеров, включая главный ген карликовости *Ddw1*. Среднее расстояние между смежными маркерами было около 10 cM. Десять из 21 QTL были картированы на хромосоме 5RL в области *Ddw1*. Помимо ожидаемого воздействия на высоту растения и длину стебля, на которые, вероятно, влияет наличие главного гена карликовости, был найден дополнительный эффект этой области на урожайность и время цветения. Это могло быть вызвано плейотропным действием *Ddw1*. Еще один кластер генов, состоящий из четырех QTL, контролирующих время цветения и компоненты урожайности, был открыт в центромерном районе хромосомы 2R. Другие локусы были распределены по хромосомам 1R (1), 4R (1), 6R (3) и 7R (1) (Börner et al., 2000).

Суммарно на всех хромосомах ржи обнаружено около 120 QTL (Schlegel, Korzun, 2015, рис. 5). В хромосоме 5R был найден QTL, влияющий на прорастание ржи на корню (Tenhola-Roininen et al., 2011). Для 289 локусов была построена карта сцепления с использованием картирующей популяции двойных гаплоидов из потомства от скрещивания сортов ржи Amilo × Voima, расщепляющегося по признаку «прорастание на корню». Генетическая карта была расширена до 732 cM (т. е. один локус на 2,5 cM) с помощью AFLP, SSR, RAPD, REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism – полиморфизм последовательностей, амплифицированных между ретротранспозонами и микросателлитами), IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism – полиморфизм по-

Таблица 3. Локусы количественных признаков, картированные на хромосомах ржи (Schlegel, Korzun, 2015)

Номер локуса	Признак	Хромосомная локализация
89	Способность к укоренению	1RS
53, 54	Толщина 2-го междоузлия	5RS, 7RL
49, 50, 51, 52	Длина флагового листа	2RL, 3RL, 4RL, 5RL
3, 33, 34	Высота растения	3RL, 5RL2.3
4	Высота стебля	5RL2.3
14, 15, 16, 17	Содержание хлорофилла в листьях	1RL, 3RS, 4RL, 5RL
2	Число колосьев на растение	2R
113, 114	Число колосков в колосе	3R, 5R
5	Число цветков в колосе	6R
6, 55, 56, 57, 58, 59, 115	Число семян в колосе	2R, 2RS, 3RL, 5RL, 3RS, 3RS, 4R
13	Число семян в колоске (выявлен у пшеницы)	1RS
39, 40, 41	Длина семени	2RS, 3RL, 5RL
42, 43, 44, 45, 46	Толщина семени	1RS, 2RL, 3RL, 5RS, 5RL
35	Длина колоса	5RL
7	Продуктивность колосьев на главных побегах	2R, 5RL
116, 117, 118, 119	Вес зерна на колос	2R, 3R, 4R, 6R
8, 36, 37, 38, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 120	Масса 1000 зерен	1R, 2RL, 3RL, 4R, 5RL, 6R, 7R
9	Выход соломы	5RL, 6RL
47, 48	Время колошения	4RS, 5RL
1	Время цветения, дни после посева	2RL, 5RL, 7R
12	Засухоустойчивость	2R, 4R
18, 19, 20, 21, 22, 23	Чувствительность проростков к гиббереллoвой кислоте	1RS, 1RL, 2RS, 5RL, 7RL
108, 109	Реакция на культивирование ткани отрицательная, незрелые зародыши, продуцирующие эмбриогенный каллус	5R, 6R
110, 111	Реакция на культивирование ткани положительная, незрелые зародыши, продуцирующие эмбриогенный каллус	1R, 6R
60, 61, 62, 63, 64, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86	Прорастание на корню	1RL, 2RL, 3RS, 4RL, 5RS, 5RL, 6RS, 6RL, 7RS, 7RL
24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 87, 88	Активность α-амилазы	1RS, 1RL, 2RS, 2RL, 3RS, 3RL, 4RS, 4RL, 5RS, 5RL, 6RS, 6RL, 7RS, 7RL
95, 96, 97, 98, 99	Содержание крахмала	1R, 2R, 3R, 5R, 7R
91, 92, 93, 94	Содержание белка	3R, 5R, 6R, 7R
90	Содержание пентоз	7R
112	Чувствительность к фузариозу	5RL
10, 11	Rf_{clb} – восстановитель ЦМС; Rf_c2 – восстановитель ЦМС	4RL, 6RS

следовательностей, амплифицированных между ретротранспозонами), ISSR и SRAP (sequence-related amplified polymorphism – полиморфизм последовательностей, амплифицированных с открытых рамок считывания) маркеров. Нарушенное расщепление популяции по данным маркерам было отмечено на всех хромосомах. Был найден один главный QTL, влияющий на активность α-амилазы и отвечающий за 16,1 % ее фенотипической изменчивости. Этот QTL находится на длинном плече хромосомы 5R. Теперь микросателлитные маркеры SCM74, RMS1115 и SCM77, ближайшие к этому QTL, можно использовать для маркер-контролируемого отбора в селекционной программе по снижению потерь от прорастания на корню (Tenhola-Roininen et al., 2011).

Myskow с коллегами (2012) сообщили о QTL, влияющих на активность α-амилазы, локализованных на генетической карте, полученной с помощью популяции рекомбинантных инбредных линий ржи S120 × S76. Линии сравнили по прорастанию на корню и сроку колошения. Было идентифицировано 14 локусов активности α-амилазы на всех семи хромосомах. Вклад обнаруженных QTL в изменчивость активности α-амилазы составлял от 6,1

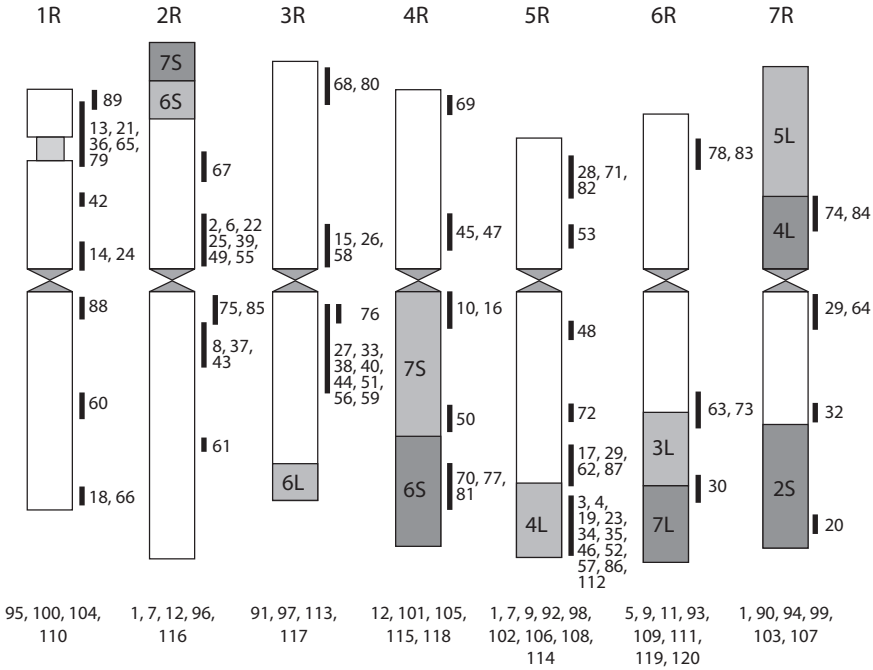


Рис. 5. Примерное распределение локусов количественных признаков (QTL), картированных на хромосомах ржи в различных работах. QTL, ассоциированные с хромосомой или плечом, но не с определенным хромосомным участком, приведены цифрами под схемой хромосомы. Соответствие номеров QTL их названиям приведено в работе Schlegel, Korzun (2015). Кариотип показывает как отдельные хромосомы, так и предполагаемые хромосомные обмены (см. текст и табл. 3).

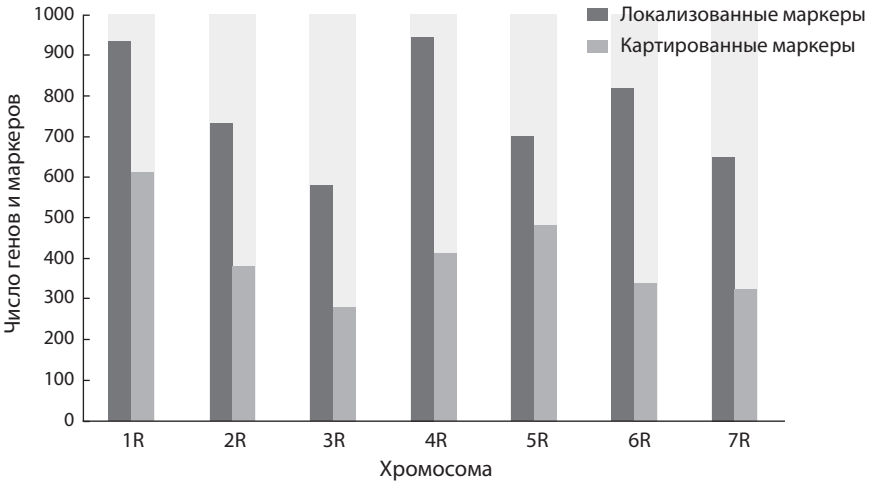


Рис. 6. Число генов и маркеров, локализованных с точностью до хромосомы (закрашенные столбцы) и число генов и маркеров, нанесенных на карты сцепления отдельных хромосом (белые столбцы), согласно последним данным (Schlegel, Korzun, 2015).

до 23,3 %. Наименьшее значение LOD (2,2) отмечено для локуса *QAa4R-M3*, а наибольшее (7,8) – для *QAa7R-M1*. Было обнаружено шесть совпадений между локусами, контролирующими активность α-амилазы и прорастание на корню (1R, 3R, 4R, 6R, 7R), и столько же между локусами, детерминирующими прорастание на корню и сроки колошения (1R, 2R, 6R, 7R). Один интервал, частично общий для всех трех признаков, был картирован на длинном плече хромосомы 1RL. Среди статистически значимых маркеров, отобранных по критерию Краскела – Уоллиса ($p < 0{,}005$), было 55 общих для прорастания на корню и сроков колошения (1R, 2R, 6R), 30 маркеров, совпадающих для α-амилазной активности и прорастания на корню (5R, 7R), и один маркер α-амилазной активности и сроков колошения (6R). Известные QTL и их распределение по хромосомам сведены на рис. 5.

Картирование QTL можно успешно применять при отборе растений в расщепляющихся популяциях ржи. Хотя селективное влияние ряда QTL, связанных с продуктивностью и некоторыми количественными признаками, невелико, есть несколько главных локусов, влияющих на признаки «масса 1 000 зерен», «натурная масса», «число падения» и на содержание крахмала, которые вносят большой вклад в генотипическую изменчивость. Эти локусы можно использовать в маркер-контролируемом отборе и в дальнейшем генетическом анализе.

Использование методов высокопроизводительного секвенирования

Разработка и применение новых методов генетического анализа, подходов для определения хромосомного набора и манипуляций с хромосомами, а также выяснение гомеологии хромосом разных видов трибы Triticeae способствовали существенному расширению знаний о генетике и цитогенетике ржи. На основе картирования транскриптов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования, использования данных чернового секвенирования хромосом ржи и сопоставления с известными данными о синтенных районах отсеквенированных геномов трех модельных видов злаков (*Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa* и *Sorghum bicolor*), была получена виртуальная модель порядка генов ржи («геномная молния»), включающая 22 426 генов (72 % от выявленных 31 008 генов) (Martis et al., 2013). Эта модель позволила определить 17 консервативных синтенных блоков сцепления, составляющих геном ржи. Она подтвердила наличие шести крупных транслокаций при формировании современного генома ржи, которыми он отличается от предполагаемого предкового генома

Triticeae. Наиболее ранняя транслокация произошла между предковыми хромосомами 4 и 5 до эволюционного расхождения пшеницы и ржи. Следующие транслокации произошли между хромосомами 3 и 6, 6 и 7, 4 и 7, 2 и 7 и 4 и 6 (рис. 5). Ранее их предположили К. Девос и М. Гэйл (Devos, Gale, 1997). По сравнению с геномами родственных злаков геном ржи формировался преимущественно за счет интрогрессивной гибридизации и путем сетчатой эволюции (Martis et al., 2013).

В течение длительного времени генетика ржи развивалась медленнее, чем генетика других диплоидных культур (кукуруза, ячмень, томат или горох), однако сейчас ее развитие ускорилось, а полученные данные уже можно применять для маркер-ориентированной селекции. Несмотря на предсказанные трудности получения маркеров для ржи (Jain, 1960), сейчас уже имеется значительное количество генетических и цитологических маркеров для всех хромосом ржи. На основе сопоставления данных, полученных в результате генетического анализа ржи, пшеницы, тритикале, а также пшенично-ржаных дополненных и замещенных линий, было составлено подробное описание обозначений генных символов, локализации и сцепления генов ржи (Schlegel, Korzun, 2015).

С 1960 г. (с момента выхода работы Jain, 1960) с дополнениями в 1982, 1986, 1996 и 1998 г.г. в геноме ржи локализовано свыше 2 000 биохимических, молекулярных и морфологических маркеров (рис. 6). Из них 90 % составляют молекулярные маркеры (Rogowsky et al., 1992; Quarrie et al., 1994). Биохимические маркеры составляют 8 % (Hull et al., 1992), а морфологические – 2 %. Первые молекулярные карты сцепления ржи опубликованы в начале 1990-х годов. Уже тогда они содержали подходящие маркеры для признаков, важных в гибридной селекции ржи, связанных с устойчивостью и репродуктивностью (Dreyer et al., 1996). Протяженность карт сцепления ржи варьирует от 340 до 3 145 сМ. Первые генетические карты включали ограниченное число генных маркеров (Gustafson et al., 2009; Hackauf et al., 2009). С помощью RNAseq-анализа удалось выявить большой набор связанных с генами SNP-маркеров, которые стали основой для развития высокопроизводительного генотипирования ржи с использованием 5 234 маркеров (Haseneyer et al., 2011; Milczarski et al., 2011). Позднее SNP анализ был использован для построения карты транскриптов ржи с высокой плотностью. В совокупности с данными чернового секвенирования хромосом ржи после их сортировки методом проточной цитофлюориметрии с последующей амплификацией эти данные позволили получить высокоплотную карту линейного порядка генов ржи. Это дало возможность провести углубленный сравнительный генетического анализа геномов ржи и других злаков, что привело к пересмотру модели эволюции генома ржи (Martis et al., 2013).

Сто пятьдесят лет селекции и фундаментальных исследований ржи дали колоссальные результаты. Данный период может быть условно разделен на три этапа: первый начался с направленного отбора ржи в семеноводческом хозяйстве Probsteier в 1850 г., второй ведет отсчет с момента получения сорта Petkus. В 1970 г. с открытием Р-цитоплазмы и в связи с началом применения ЦМС для производства гибридных семян начался третий этап развития генетико-селекционных исследований на ржи. Он совпал с появлением молекулярных методов в генетике. В результате как в цитологии, так и в генетике ржи достигнуты значительные успехи, в том числе идентифицированы и охарактеризованы все хромосомы, на них с высоким разрешением (на генетическом расстоянии до 1 сМ) картировано в общей сложности более 5 400 генных и маркерных локусов. Такие маркеры пригодны для мечения порядка 70 % генов ржи от общего количества, составляющего примерно 30 000 генов. Для некоторых генов и маркеров проведено уже и физическое картирование. Этот объем данных открывает многочисленные возможности для более эффективной селекции ржи.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Кобылянский В.Д. Цитоплазматическая мужская стерильность у диплоидной ржи. Вестн. с.-х. науки. 1969;6:18-22.

Кобылянский В.Д., Катерова А.Г. Наследование цитоплазматической и ядерной мужской стерильности у озимой диплоидной ржи. Генетика. 1973;9:5-11.

Лукьяненко П.П. Селекция и семеноводство озимой пшеницы. Избр. тр. М.: Колос, 1973.

Adolf K., Neumann H. Probleme bei der Entwicklung und Nutzung eines Funktionssystems für die Hybridzüchtung beim Roggen. Tag. Ber. AdL, Berlin (Germany). 1981;191:61-72.

Bartos P., Bares I. Leaf and stem rust resistance of hexaploid wheat cultivars Salzmünder Bartweizen and Weique. Euphytica. 1971;20: 435-440.

Berkner F., Meyer K. Morphologische Studien an Roggenähren aus Anatolien. Z. Pflanzenzücht. 1927;12:229-245.

Bolibok-Brągoszewska H., Heller-Uszyńska K., Wenzl P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. DArT markers for the rye genome – genetic diversity and mapping. BMC Genomics. 2009;10: 578-586.

Börner A., Korzun V., Voylokov A.V., Worland A.J., Weber W.E. Genetic mapping of quantitative trait loci in rye (*Secale cereale* L.). Euphytica. 2000;116:203-209.

Brewbaker H.E. Studies of self-fertilization in rye. Univ. Minn. Agric. Exp. State Tech. Bull. 1926;40:1-24.

Chikmawati T., Skovmand B., Gustafson J.P. Phylogenetic relationships among *Secale* species revealed by amplified fragment length polymorphisms. Genome. 2005;48:792-801.

Devos K.M., Gale M.D. Comparative genetics in the grasses. Plant Mol. Biol. 1997;35:3-15.

Dohmen G., Tudzynski P. A DNA-polymerase-related reading frame (pol-r) in the mtDNA of *Secale cereale*. Curr. Genet. 1994;25: 59-65.

Dreyer F., Miedaner T., Geiger H.H. Chromosomale Lokalisation von Restorergenen aus argentinischen und iranischen Roggen (*Secale cereale* L.). Vortr. Pflanzenzücht. 1996;32:49-51.

Dundas I.S., Frappell D.E., Crack D.M., Fisher J.M. Deletion mapping of a nematode resistance gene on rye chromosome 6R in wheat. Crop Sci. 2001;41:1771-1778.

Falke K.C., Susic Z., Hackauf B., Korzun V., Schondelmaier J., Wilde P., Wehling P. Establishment of introgression libraries in hybrid rye (*Secale cereale* L.) from an Iranian primitive accession as a new tool for rye breeding and genomics. Theor. Appl. Genet. 2008;117: 641-652.

Falke K.C., Susic Z., Wilde P., Wortmann H., Möhring J., Piepho H.-P., Geiger H.H., Miedaner T. Testcross performance of rye introgression lines developed by marker-assisted backcrossing using an Iranian accession as donor. Theor. Appl. Genet. 2009;118:1225-1238.

Frederiksen S., Peterson G. A taxonomic revision of *Secale* (Triticeae, Poaceae). Nordic J. Bot. 1998;18:399-420.

Frimmel F., Baranek F. Beitrag zur Methodik der Roggenzüchtung und des Saatgutbaues. Z. Zücht. 1935;20:1-20.

Geiger H.H., Miedaner T. Genetic basis and phenotypic stability of male fertility restoration in rye. Vortr. Pflanzenzücht. 1996;35:27-38.

Geiger H.H., Miedaner T. Hybrid rye and heterosis. Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Eds J.G. Coors, S. Pandey. Crop Science Society, America, Madison, WI, 1999.

Geiger H.H., Miedaner T. Rye breeding. Handbook of Plant Breeding, Cereals. Ed. M.J. Carena. Springer Publishing, N.Y., 2009;3: 157-181.

Geiger H.H., Schnell F.W. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Sci. 1970;10:590-593.

Geldermann H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. Theor. Appl. Genet. 1975;46:319-330.

Glass C., Miedaner T., Geiger H.H. Lokalisation von Restorergenen der Winterroggenlinie L18 mit RFLP-Markern. Vortr. Pflanzenzücht. 1995;31:52-55.

Gustafson J.P., Butler E., McIntyre C.L. Physical mapping of a low-copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). Prod. Nat. Acad. Sci. USA. 1990;87:1899-18902.

Gustafson J.P., Ma X.-F., Korzun V., Snape J.W. A consensus map of rye integrating mapping data from five mapping populations. Theor. Appl. Genet. 2009;118:793-800.

Hackauf B., Rudd S., Voort van der J.R., Miedaner T., Wehling P. Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. Theor. Appl. Genet. 2009;118:371-384.

Haseneyer G., Schmutzer T., Seidel M., Zhou R., Mascher M., Schön C.C., Taudien S. From RNA-seq to large-scale genotyping – Genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). BMC Plant Biol. 2011;11:131. DOI:10.1186/1471-2229-11-131

Heribert-Nilsson N. Morphologische Studien an Roggenähren aus Anatolien. Z. Pflanzenzücht. 1916;5:89-113.

Heslot N., Akdemir D., Sorrells M.E., Jannink J.-L. Integrating environmental covariates and crop modeling into the genomic selection framework to predict genotype by environment interactions. Theor. Appl. Genet. 2014;127:463-480.

Hull G.A., Sabelli P.A., Shewry P.R. Restriction fragment analysis of the secalin loci of rye. Biochem. Genet. 1992;30:85-97.

Jain S. K. Cytogenetics of rye (*Secale* ssp.). Bibliogr. Genet. 1960;19: 1-86.

Kattermann G. Zur Cytologie halmbehaarter Stämme aus Weizenroggenbastardierung. Züchter. 1937;9:196-199.

Krasnyuk A.A. *Secale cereale*×*Agropyron cristatum* hybrids. Soc. Grain Farm. 1936;1:106-115.

Łapiński M. Cytoplasmic-genic type of male sterility in *Secale montanum* Guss. Wheat Inform. Serv. 1972;35:25-28.

Mahone G.S., Frisch M., Miedaner T., Wilde P., Wortmann H., Falke K.C. Identification of quantitative trait loci in rye introgression lines carrying multiple donor chromosome segments. Theor. Appl. Genet. 2013;126:49-58.

Martis M.M., Zhou R., Haseneyer G., Schmutzer T., Vrána J., Kubaláková M., König S., Kugler K.G., Scholz U., Hackauf B., Korzun V., Schön C.-C., Doležel J., Bauer B., Klaus F.X., Mayer K.F.X., Stein N. Reticulate evolution of the rye genome. Plant Cell. 2013;25: 3685-3698.

Melz G., Melz G., Hartmann F. Genetics of a male-sterile rye of «G-type» with results of the first F1-hybrids. Proc. 7th EUCARPIA Conf. July 4–7. Radzikow, Poland, 2001.

Melz G., Melz G., Hartmann F. Genetics of a male-sterile rye of «G-type» with results of the first F1-hybrids. Plant Breed. Seed Sci. 2003;47:47-55.

Miedaner T., Glass C., Dreyer F., Wilde P, Wortmann H., Geiger H.H. Mapping of genes for male-fertility restoration in «Pampa A» CMS winter rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 2000;101: 1226-1233.

Miedaner T., Schwegler D.D., Wilde P., Reif J. C. Association between line per se and testcross performance for eight agronomic and quality traits in winter rye. Theor. Appl. Genet. 2014;127:33-41.

Milczarski P., Bolibok-Brągoszewska H., Myśków B., Stojałowski S., Heller-Uszyńska K., Góralska M., Brągoszewski P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. A high density consensus map of rye (*Secale cereale* L.) based on DArT markers. PLoS ONE. 2011;6:e28495.

Mohan A., Goyal A., Singh R., Balyan H.S., Gupta P.K. Physical mapping of wheat and rye expressed sequence tag–simple sequence repeats on wheat chromosomes. Crop Sci. 2007;47:3-13.

Myśków B., Stojałowski S., Łań A., Bolibok-Brągoszewska H., Rakoczy-Trojanowska M., Kilian A. Detection of the quantitative trait loci for α-amylase activity on a high-density genetic map of rye and comparison of their localization to loci controlling preharvest sprouting and earliness. Mol. Breed. 2012;30:367-376.

Nilsson-Ehle H. Einige Beobachtungen über erbliche Variationen der Chlorophylleigenschaft bei den Getreidearten. Z. Ind. Abst. Vererbungsl. 1913;9:289-300.

Nilsson-Ehle H. Inzucht als Züchtungsmethode. Züchtungskunde. 1928;3:257-271.

O'Mara J.G. The substitution of a specific Secale *cereale* chromosome for a specific *Triticum aestivum* chromosome. Genetics. 1947;32: 99-100.

Pammer G. Über Veredelungszüchtungen mit einigen Landsorten des Roggens in Niederösterreich. Z. Landw. Versuchswesen. 1905;8: 1015-1053.

Peterson R.F. Improvement of rye through in-breeding. Sci. Agric. 1934;14:651-668.

Quarrie S.A., Steed A., Semikhodsky A., Calestani C., Fish L., Galiba G., Sutka J., Snape J.W. Identifying quantitative trait loci (QTL) for stress response in cereals. Annu. Rep. of John Innes Centre & Sainsbury Laboratory, Norwich, 1994.

Rajaram S., Maan C.E., Ortiz-Ferrara A., Mujeeb-Kazi A. Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan, 1983.

Ramage R.T. Balanced tertiary trisomics for use in hybrid seed production. Crop Sci. 1965;5:177-178.

Riley R., Chapman V., Miller T.E. Hairy necked Viking. Ann. Rep. Plant Breed. Inst. Cambridge, U.K., 1970.

Rimpau W. Züchtung auf dem Gebiete der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Mentzel & von Lengerke's Landwirtschaftl. Kalender, 1883;II:33-92.

Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences. Genome. 1992;35:621-626.

Roemer T., Rudorf W. Handbuch der Pflanzenzüchtung. Bd. 2. Grundlagen der Pflanzenzüchtung. P. Parey Verlag, Berlin/Hamburg, Germany, 1950.

Rümker von K., Leidner R. Ein Beitrag zur Frage der Inzucht bei Roggen. Z. Pflanzenzücht. 1914;2:427-444.

Santos E., Matos M., Silva P., Figueiras A.M., Benito C., Pinto-Carnide O. Phylogenetic relationships of genus *Secale* revealed by RAPD and ISSR markers. Genet. Res. Crop Evol. 2015. in press.

Schlegel R. Dictionary of Plant Breeding, 2nd ed. Taylor & Francis, Inc., N.Y., 2009.

Schlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2015;03-15:1-18. http://www.rye-gene-map.de/rye-introgression

Schlegel R., Korzun V. About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany. Plant Breed. 1997;116:537-540.

Schlegel R., Korzun V. Genes, markers and linkage data of rye (*Secale cereale* L.). 10th uptaded inventory. 2015;03.15:1-115. http://www.rye-gene-map.de

Schlegel R., Meinel A. A quantitative trait locus (QTL) on chromosome arm 1RS of rye and its effect on yield performance of hexaploid wheat. Cereal Res. Commun. 1994;22:7-13.

Schlegel R., Weryszko E. Intergeneric chromosome pairing in different wheat-rye hybrids revealed by the Giemsa banding technique and

some implications on karyotype evolution in the genus Secale. Biol. Zbl. 1979;98:399-407.

Schlegel R., Kynast R., Schwarzacher T., Römheld V., Walter A. Mapping of genes for copper efficiency in rye and the relationship between copper and iron efficiency. Plant Soil. 1993;154:61-65.

Schnell F.W. Roggen. Dreißig Jahre Züchtungsforschung. Ed. W. Rudorf. G. Fischer Verl., Stuttgart (Germany), 1959.

Shang H.-Y., Wei Y.-M., Wang X-R., Zheng Y.-L. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. Genet. Mol. Biol. São Paulo. 2006;29:685-691.

Sirks M.J. Über einen Fall vererbbarer Lichtempfindlichkeit des Chlorophylls beim Roggen (*Secale cereale*). Genetica. 1929;11:375-386.

Steglich R., Pieper H. Vererbungs- und Züchtungsversuche mit Roggen. Fühlings Landw. Ztg. 1922;71:201-221.

Steinborn R., Schwabe W., Weihe A., Adolf K., Melz G., Börner T. A new type of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.): analysis of mitochondrial DNA. Theor. Appl. Genet. 1993;85: 822-824.

Stojałowski S., Łapiński M., Szklarczyk M. Identification of sterility-inducing cytoplasms in rye using the plasmotype – genotype interaction test and newly developed SCAR markers. Theor. Appl. Genet. 2006;112:627-633.

Sybenga J. Critical appraisal of balanced chromosomal ms systems in hybrid rye breeding. EUCARPIA Meet. Cereal Sect., Rye, Svalöv (Sweden). 1985.

Tahmasebi S., Heidari B., Pakniyat H., Dadkhodaie A. Consequences of 1BL/1RS translocation on agronomic and physiological traits in wheat. Cereal Res. Commun. 2015. DOI: 10.1556/0806.43.2015.016

Tenhola-Roininen T., Kalendar R., Schulman A.H., Tanhuanpää P. A doubled haploid rye linkage map with a QTL affecting α-amylase activity. J. Appl. Genet. 2011;52:299-304.

Treboux O. Beobachtungen über Vererbung yon Kornfarbe und Anthocyan beim Roggen. Z. Pflanzenzücht. 1925;10:288-291.

Tschermak E. Die Züchtung neuer Getreiderassen mittels künstlicher Kreuzung. II. Kreuzungsstudien an Roggen. Z. landw. Versuchsw. 1906;9:699-743.

de Vries J.N., Sybenga J. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set. Z. Pflanzenzücht. 1984;92:117-139.

Vries de J.N., Sybenga J. Meiotic behaviour of telo-tertiary compensating trisomics of rye: Evaluation for use in hybrid varieties. Theor. Appl. Genet. 1989;78:889-896.

Wang Y., Mette M.F., Miedaner T., Gottwald M., Wilde P., Reif J.C., Zhao Y. The accuracy of prediction of genomic selection in elite hybrid rye populations surpasses the accuracy of marker-assisted selection and is equally augmented by multiple field evaluation locations and test years. BMC Genomics. 2014;15:556. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4101178/

Warzecha R., Salak-Warzecha K. A new source of male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Plant Breed. Seed Sci. 2003;48:61-65.

Whittaker I.C., Thompson R., Denham M.C. Marker-assisted selection using ridge regression. Genet. Res. 2000;75:249-252.

Zeller F.J. 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp. Columbia, USA, 1973.

Zeller F.J., Günzel G., Fischbeck G., Gertenkorn P., Weipert D. Veränderungen der Backeigenschaften der Weizen-Roggen-Translokationssorten. Getreide Mehl Brot. 1982;36:141-143.

Zohary D. Origin of southwest Asiatic cereals: Wheats, barley, oats and rye. Plant Life of South-West Asia. Eds P.H. Davis et al. Aberdeen University Press, Aberdeen, 1971.

Перевод с английского В.В. Гулевича

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):604-612
DOI 10.18699/VJ15.077

Подходы по улучшению качества зерна пшеницы: селекция на число падения

В.А. Крупнов, О.В. Крупнова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия

Число падения (ЧП) отражает уровень активности альфа-амилазы в зерне/муке и является международным стандартом качества зерна. Чем ниже ЧП, тем ниже качество зерна и его цена. Главные причины снижения ЧП – видимое или скрытое предуборочное прорастание (ПП) в условиях неблагоприятной погоды. Решающую роль в получении стабильно высокого ЧП играет селекция на устойчивость к предуборочному прорастанию (УкПП), а также непосредственно на ЧП. В последние десятилетия достигнут большой прогресс в понимании биохимических и молекулярных процессов, происходящих при ПП; изучении генетического контроля УкПП и ЧП, в разработке методов селекции на УкПП и ЧП. В России селекция на эти признаки и соответствующие теоретические исследования еще не получили должного развития и отражения в литературе. Показаны генетическая сложность и контекст-зависимость признаков УкПП и ЧП. Специфика селекции на высокий уровень УкПП и ЧП включает удаление LMA-генотипов (LMA, late maturity α-amylase) при подборе родителей для скрещивания и в ранних поколениях гибридов, выбор генетически различных доноров целевых признаков, методы оценки сортов и линий на УкПП и ЧП в разных условиях внешней среды, определение размера F_2 популяций с учетом необходимости сочетания УкПП и ЧП с высокой продуктивностью, качеством зерна и другими признаками. Новые перспективы в селекции открывают новые подходы и методы, в частности перевод гетерозигот в гомозиготное состояние (DH-метод), а также ДНК-технологии, обеспечивающие обоснованный подбор доноров УкПП и ЧП, пирамидирование желательных аллелей и эффективный отбор с помощью функциональных или тесно сцепленных молекулярных маркеров.

Ключевые слова: альфа-амилаза; устойчивость к предуборочному прорастанию; число падения; молекулярные маркеры.

Approaches to improve wheat grain quality: breeding for falling number

V.A. Krupnov, O.V. Krupnova

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

Falling number (FN) reflects the level of alpha amylase activity in grain. The main factor responsible for high α amylase levels and low FN values is visible or hidden preharvest sprouting (PHS) under adverse weather conditions. In recent decades, great progress has been made in the understanding of biochemical and molecular processes accompanying PHS and the genetic control of preharvest sprouting resistance (PHSR) and FN, as well as in the development of methods of breeding for PHSR and FN. However, breeding for these traits and the corresponding theoretical studies have not yet been properly developed or reflected in the Russian literature. The purpose of the review is to fill this gap. It illustrates the genetic complexity and context dependence of the PHSR and FN traits and of major factors impairing FN. A specific feature of breeding for high PHSR and FN is that it involves elimination of late maturity α-amylase (LMA) genotypes in choosing parents for crossing and from early hybrid generations; choice of donors of target traits with regard to their genetic diversity; methods of evaluation of varieties and lines for PHSR and FN under different environmental conditions; determination of F_2 population size with regard to combination of PHSR, FN, high performance, grain quality, and other commercial traits. New methods and approaches in breeding open new prospects. They include the doubled haploid (DH) method, allowing homozygotes to be obtained from early hybrid generations; and DNA technologies, which permit genetically reasonable selection of PHSR and FN donors, pyramiding of desirable alleles, and efficient selection of desired offspring using closely linked molecular markers.

Key words: alpha amylase; preharvest sprouting resistance; falling number; molecular markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Крупнов В.А., Крупнова О.В. Подходы по улучшению качества зерна пшеницы: селекция на число падения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):604-612. DOI 10.18699/VJ15.077

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Krupnov V.A., Krupnova O.V. Approaches to improve wheat grain quality: breeding for falling number. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):604-612. DOI 10.18699/VJ15.077

УДК 633.111:321 631.524.7
Поступила в редакцию 07.01.2015 г.
Принята к публикации 17.02.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: vasiliy_krupnov@mail.ru

Пшеница является одним из основных источников калорий и белка в питании человека. Благодаря своим биологическим особенностям и уникальному качеству зерна она стала самым распространенным хлебным растением в мире, в том числе и в России. Мировое производство пшеницы превышает 650 млн т в год, и потребности в зерне непрерывно возрастают (FAO, 2010). Во многих странах и также в России в посевах озимой и яровой пшеницы господствуют краснозерные сорта, но самым высоким спросом пользуется белое зерно, которое дает максимальный, высокий выход муки, позволяет получать различные виды макаронных изделий высокого качества, оно также более пригодно для использования в целом виде, что весьма полезно для здоровья человека. Уместно отметить, что в Нижнем Поволжье РФ и прилегающих регионах с 1930 до 1970-х гг. прошлого века вместо краснозерных возделывали белозерные сорта яровой мягкой пшеницы, среди них такие «сорта-миллионеры», как Саррубра (1,3 млн га в 1938 г.), Альбидум 43 (6,2 млн га в 1960 г.), Саратовская 210 (1,5 млн га в 1967 г.), Саратовская 38 (0,76 млн га в 1967 г.) (Мамонтова, 1980). Однако из-за возрастания риска ПП вместо белозерных теперь выращивают краснозерные сорта яровой и озимой пшеницы.

В годы с неблагоприятной погодой (дожди, росы, холод) в период налива зерна и уборки урожая страдают и многие краснозерные сорта, для этого достаточно небольшого количества осадков (около 10–15 мм), особенно при медленном их выпадении (Mares, Mrva, 2014). Симптомы прорастания – разрыв оболочки в области зародыша, сморщивание и обесцвечивание семени, а затем появление корешка и побега. В процессе прорастания разрушается крахмал, деградируют белки и другие вещества, ухудшаются физические и технологические свойства зерна (проблемы размола, размягчение и липкость теста, снижение объема и крошение выпекаемого хлеба и т. д.) (Козьмина, 1976; Fu et al., 2014). Кроме того, в проросшем зерне повышается концентрация свободного аспарагина, что неблагоприятно для здоровья человека (Simsek et al., 2014).

Разрушение крахмала в эндосперме в результате активности фермента альфа-амилазы может происходить и без признаков видимого прорастания зерна (Mares, Mrva, 2008), что важно учитывать как при хранении зерна, так и его использовании в мукомольной, хлебопекарной и других отраслях производства.

В ряде стран ведется учет потерь от ПП, например, в Канаде они составляют около 100 млн долларов в год (DePauw et al., 2012). К сожалению, об аналогичных исследованиях в Российской Федерации нам не известно. Однако как в европейской, так и в азиатской части Российской Федерации неблагоприятная погода в предуборочный период – далеко не редкость (например, в 2013, 2014 гг.).

Наиболее простым, быстрым и надежным методом определения качества зерна является измерение числа падения на приборе «Falling Number», предложенном свыше полувека назад Хагбергом (Hagberg, 1960) и усовершенствованном Пертеном (Perten, 1964). Метод основан на способности альфа-амилазы гидролизовать крахмал до декстринов. Чем выше активность альфа-амилазы в суспензии, тем быстрее и ниже опускается шток-мешалка в пробирке прибора, что выражается в секундах. Низкое ЧП свидетельствует о высокой активности альфа-амилазы.

В Российской Федерации, согласно ГОСТ 52554-2006, у зерна первого и второго класса ЧП должно быть не ниже 200 с, при этом допускается до 5 % проросшего зерна «в зерновой примеси». Единичные проросшие зерна могут быть даже при ЧП в диапазоне от 200 до 300 с. В таком крупном экспортере зерна, как Австралия, программами предусмотрено создание сортов со средним значением ЧП не ниже 350 с (Ellis et al., 2012), а в Канаде – 400 с и более (DePauw et al., 2012).

Повышение требований к генетическому потенциалу сортов по ЧП возникло не случайно. Колебания климата и связанное с этим возрастание непредсказуемости погоды дают основание предполагать возрастание риска ПП и низкое ЧП (Flintham et al., 2011). Между тем, например, в Поволжье за 100 лет научной селекции какого-либо сдвига в уровне УкПП и ЧП у озимой пшеницы не произошло: у новых сортов они такие же низкие, как у старых (Крупнова, Свистунов, 2014), хотя потенциал продуктивности повышен значимо (Прянишников и др., 2009).

Факторы стабильности высокого числа падения

Значение признака ЧП зависит как от генотипа, так и от условий внешней среды в предуборочный период. В условиях «комфорта» многие сорта обычно показывают высокий уровень ЧП (свыше 350–400 с). В условиях, провоцирующих прорастание (активность альфа-амилазы), различия между сортами/линиями по ЧП возрастают, при этом у восприимчивых к прорастанию ЧП может снижаться до минимума (60 с). В селекционной практике все изучаемые генотипы нередко условно разбивают на три группы: низкое ЧП (ниже 150–200 с), среднее (200–350 с) и высокое (выше 350 с) (Dencic et al., 2013).

Главные причины снижения ЧП: 1) отсутствие у сортов устойчивости к прорастанию в дождливую погоду в предуборочный период и 2) наличие у сортов так называемых дефектных генов, повышающих уровень активности альфа-амилазы в середине процесса созревания зерна без видимых признаков прорастания, несмотря на отсутствие дождя (LMA, late maturity α-amylase) (Lun et al., 2001; Barrero et al., 2013).

Основным источником энергии для прорастания служит крахмал, содержание которого в зерне до 70 %, он состоит из двух фракций: амилопектин (75 %) и амилоза (25 %). Деградация крахмала происходит в результате синергизма различных амилолитических ферментов (Whan et al., 2014), среди которых наиболее важную роль играет альфа-амилаза (EC 3.2.1.1, α-1,4-glucanohydrolase). Идентифицирован ряд изоформ альфа-амилазы (Barrero et al., 2013). Высокий уровень ферментов контролируется семейством α-*Amy-1*-генов, локализованных на длинных плечах хромосом 6-й группы (6A, 6B, 6D) (McIntosh et al., 2008).

В природе вступление созревающих семян в покой является важным признаком приспособления растений к окружающей среде – выжидание наступления благоприятных условий (Finch-Savage, Leubner-Metzger, 2006). Индукция и реализация покоя семян связаны с экспрессией многих

генов и их взаимодействием с факторами внешней среды (температура, вода и др.), одни гены контролируют созревание семян, другие – вступление в покой, его глубину и продолжительность, третьи – выход из покоя (Graeber et al., 2012). В регулировании покоя семян важную роль играют транскрипционные факторы, абсцизовая кислота (АБК), гиббереллин (ГК), жасмонат и другие гормоны (Barrero et al., 2013; Jacobsen et al., 2013). Ключевым детерминантом покоя является АБК, роль этого и других гормонов в УкПП нуждается в дальнейшем изучении (Kondhare et al., 2012; Mares, Mrva, 2014).

Давно замечено, что у краснозерных сортов УкПП, как правило, выше, чем у белозерных, и эта способность может зависеть от дозы генов, контролирующих окраску зерна (Nilsson-Ehle, 1914, по: Хлесткина, 2012). Краснозерность контролируют доминантные аллели, а белозерность – рецессивные аллели *R*-генов, локализованные на длинных плечах хромосом третьей группы: *R-A1* (прежнее название *R2*) – на 3AL, *R*-B1(*R3*) – на 3BL и *R*-D1(*R1*) – на 3DL (McIntosh et al., 2008). Доминантные *R*-аллели представляют собой Myb-подобные факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов биосинтеза флавоноидов *Chs*, *Chi*, *F3h* и *Dfr* (Himi et al., 2005, 2011; Хлесткина, 2012). Положительная роль окраски зерна в УкПП подтверждается исследованиями на почти изогенных линиях, мутантах (Warner et al., 2000; Himi et al., 2002), трансгенных растениях (Liu et al., 2013), однако молекулярные механизмы этого явления не ясны.

На расстоянии примерно 30 сМ от *R*-генов локализованы три *Vp-1*-гена-гомеолога – *Vp-A1*, *Vp-B1* и *Vp-D1* (или *TaVp-A1*, *TaVp-B1* и *TaVp-D*) (Bailey et at., 1999), которые, с одной стороны, ускоряют созревание семян, с другой – репрессируют их прорастание у различных видов растений (McCarty et al., 1991; Hoecker et al., 1995; Hollung et al., 1997; Jones et al., 1997; Bailey et al., 1999; Carrari et al., 2001; De Laethauwer et al., 2012).

У мягкой пшеницы установлен множественный аллелизм *Vp-1*-генов (Yang et al., 2007; Xia et al., 2009; Chang et al., 2010; Yang et al., 2014a,). Периоды покоя семян и УкПП наиболее тесно ассоциированы с рядом аллелей *Vp*-1B (Xia et al., 2009; Chang et al., 2010), а также с *Vp*-1A-локусом (Chang et al., 2011). Период покоя семян и УкПП можно улучшить путем встраивания в хромосому пшеницы *Vp-1*-генов от овсюга (*Avena fatua*) (McKibbin et al., 2002) или кукурузы (*Zea mays*) (Huang et al., 2012). Известны и другие поисковые подходы к повышению УкПП, например, использование мутантов с гиперчувствительностью к АБК (Schramm et al., 2013).

В последние десятилетия, благодаря использованию ДНК-технологий и статистических методов, значительно расширилось изучение генетической природы УкПП и ЧП. К настоящему времени гены/локусы (QTLs/QPhs), ассоциированные с УкПП, идентифицированы и маркированы на всех хромосомах (Крупнов и др., 2010; Tyagi, Gupta, 2012). Большинство из этих локусов являются минорными, они характеризуются весьма малым (менее 10 %) вкладом в изменчивость и сильной зависимостью от внешней среды. Мета-анализ 15 различных популяций, состоящих из рекомбинантных инбредных линий (9), удвоенных гаплоидов (5) и беккроссов (1), показал 8 *MQPhs*, в том числе на хромосомах 3A (2 *MQTL*), 3B (3 *MQTL*), 3D (2 *MQTL*) и 1 *MQTL* на хромосоме 4A (Tyagi, Gupta, 2012). У озимой белозерной мягкой пшеницы Rio Blanco основной *QPhs.pseru*-3AS колокализован с пшеничным гомологом MOTHER OF FLOWERING TIME-подобным геном (обозначен как *TaPHS1*), который является критическим регулятором УкПП (Liu et al., 2013).

Во многих исследованиях фенотипирование производилось без измерения ЧП, поэтому информации о генетическом разнообразии пшеницы по названному признаку гораздо меньше. Прежде всего, практический интерес представляет вопрос об ассоциации между ЧП и *QTLs/QPhs*. В DH популяции комбинации RL4452/AC Domain (оба имеют красное зерно) на хромосоме 4B идентифицирована ассоциация QTLs, контролирующих ЧП (*QFN.crc*-4B), индекс прорастания (*QGI.crc*-4B) и индекс прорастания зерна в колосе (*QSI.crc*-4B), каждый из которых объясняет вклад в фенотипическую изменчивость признака ЧП (22 %), GI (67 %) и SI (26 %) соответственно (Rasul et al., 2009). В DH популяции комбинации AC Domain (красное зерно)/White-RL4137 (белое зерно) установлена ассоциация ЧП с двумя QTLs на хромосомах 3BL (*QFN.crc*-3B) и 3DL (*QFN.crc*-3D) с аддитивным взаимодействием (Fofana et al., 2009).

Изучение коллекции из 110 белозерных образцов твердозерной яровой мягкой пшеницы в пяти условиях внешней среды с использованием ассоциативного картирования показало зависимость количества идентифицированных *QFN* от условий выращивания растений (Zhang et al., 2014a).

Использование в селекции мягкой пшеницы генов/транслокаций от различных сородичей в ряде случаев сопровождается расширением генетической изменчивости как по УкПП (Gatford et al., 2002), так и по ЧП (Крупнова, 2009).

На ЧП могут влиять азотное удобрение (Kindred et al., 2005; Knapowski, 2009), фунгициды (Dimmock, Gooding, 2002; Gooding, 2007), эпифитотии возбудителей болезней – *Puccinia* spp., *Septoria tritici* (Gooding, 2007), *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.(*Ptr*) (Fox et al., 2003), *Fusarium culmorum* и других видов (Gartner et al., 2008; Wang et al., 2008; Siuda et al., 2010), *Rhizoctonia cerealis* (Lemańczyk, Kwaśna, 2013). Повреждение зерна вредными клопами значимо снижает всхожесть семян, реологические свойства муки и семолины (Васильчук, 2001), ЧП (Mousa, 2011). Установлено отрицательное влияние на ЧП почернения зародыша у белозерных и краснозерных генотипов (Clarke et al., 2004; Biddulph et al., 2008; Крупнова, 2009).

В ряде публикаций сообщается о взаимосвязи ЧП с размером зерновки (Evers et al., 1995; Clarke et al., 2004; Kindred et al., 2005; Wang et al., 2008; Farrell, Kettlewell, 2009; Крупнова, 2010; Gooding et al., 2012), содержанием белка в зерне (Васильчук, 2001; Every et al., 2002; Johansson, 2002; Gooding et al., 2003; Pasha et al., 2007; Wang et al., 2008; Крупнова, 2009). На УкПП влияют степень закрытия цветка, плотность прилегания чешуй к семени, остистость колоса, угол наклона колоса, восковой налет на колосковых чешуях (King, Richards, 1984), содержание ингибиторов прорастания в колосковых стер-

женьках (Коваль и др., 2001; Gatford et al., 2002). Поэтому определение индекса прорастания семян в чашках Петри дополняют анализом прорастания семян в колосе (в лабораторных условиях или в поле) (King, Richards, 1984; Knox et al., 2012), а также определением числа падения по Хагбергу (De Pauw et al., 2012). На всхожесть семян могут влиять различные абиотические и биотические стрессоры (Singh et al., 2009), механическое повреждение семян при обмолоте и условия хранения семян или необмолоченных колосьев.

Ущерб от активности альфа-амилазы в конце созревания семян

Поздняя альфа-амилаза (late maturity α-amylase, LMA, в Англии она называется premature α-amylase, PMA) представляет собой резкое повышение (pI) содержания альфа-амилазы на 20-й–35-й день после цветения, что определяется методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Barrero et al., 2013). Предполагается, что LMA представляет собой, скорее, синдром доместикации и селекции, чем обычное явление у прародителей культивируемой пшеницы (Barrero et al., 2013). Скрининг образцов из Австралии, Англии, Германии, Китая и других стран свидетельствует о довольно частой встречаемости LMA в сортах и образцах как мягкой, так и твердой пшеницы, а также в гексаплоидных синтетиках, например *T. durum/ Aegilops tauschii* (Mrva et al., 2009). Не исключено наличие LMA-дефекта также в сортах яровой мягкой пшеницы, возделываемых в Казахстане (Мамытова и др., 2014).

В отличие от обычного, видимого, ПП у LMA-генотипов зерно внешне здоровое, и повышение уровня (pI) содержания α-амилазы наблюдается в алейроновом слое без видимых признаков прорастания семян (Mares, Mrva, 2008; Flintham et al., 2011), даже при отсутствии дождей. Активность α-амилазы в алейроне индуцируется либо похолоданием (до 10–13 °C), либо резким перепадом температуры воздуха в названный период чувствительности (Farrell, Kettlewell, 2008). Предполагается, что фенотип LMA – это частичный/неполный эффект гиббереллина в сильно изменяющейся гормональной среде (Barrero et al., 2013), однако биохимические и молекулярные механизмы LMA нуждаются в изучении (Kondhare et al., 2012; Barrero et al., 2013; Farrell et al., 2013).

LMA может быть конститутивной (экспрессия стабильная) и стохастической (экспрессия нестабильная), при которой высокий уровень альфа-амилазы встречается не во всех зернах (Mares, Mrva, 2008; Flintham et al., 2011), с различным распространением от алейрона. Генетический контроль LMA не зависит от генетического контроля обычного ПП, вызванного дождливой погодой (Flintham et al., 2011; Mares, Mrva, 2014), хотя встречаются случаи ассоциации QTLs, контролирующих LMA и ПП.

На экспрессию LMA влияют *R*-гены (Flintham et al., 2011), *Rht*-гены (Mrva, Mares, 1996; Farrell, Kettlewell, 2008; Mares, Mrva, 2008), T1BL.1RS-транслокация (Mrva, Mares, 1996; Gobaa et al., 2008). Конститутивная LMA чаще встречается у высокорослых сортов, содержащих T1BL.1RS-транслокацию или такие гены низкорослости, как *Rht8*, которые чувствительны к ГК (Mrva et al., 2008). У *Rht*-B1b, *Rht*-D1b генотипов конститутивная LMA встречается лишь при стечении определенных обстоятельств (температура, дефицит воды) (Mrva, Mares, 2001b; Mrva et al., 2008). Известны сообщения о том, что в некоторых LMA-генотипах T1BL.1RS-транслокация повышает экспрессию альфа-амилазы независимо от присутствия *Rht*-D1b (Farrell et al., 2013), тогда как в других такого взаимодействия между этими двумя генетическими факторами не наблюдалось (Mohler et al., 2014). Ранее отмечалась значимая негативная взаимосвязь между ПП и массой 1000 зерен, не исключено негативное влияние крупности зерна также на LMA (Farrell, Kettlewell, 2009).

LMA наследуется как рецессивный признак и контролируется высокозначимым QTL на 7BL и рядом других менее значимых QTLs (Mrva, Mares, 2001b; Mares, Mrva, 2008; Mrva et al., 2008; Emebiri et al., 2010; Tan et al., 2010; Flintham et al., 2011).

В условиях внешней среды, свободных от ПП, анализ трех популяций озимой мягкой пшеницы показал разное количество QTL, контролирующих ЧП, с варьированием от 1 до 8. В популяции Dream/Lynx они были локализованы на хромосомах T1BL.1RS, 6B и 7B, в популяции Bussard/W332-84 – на 4A, 5B и 7B, а в популяции AUB469511/Format – на T1BL.1RS, 4D и 7B (Mohler et al., 2014). Однако общим для всех трех популяций оказался QTL на длинном плече хромосомы 7B, вблизи от QTL, контролирующего высокую изоэлектрическую точку содержания альфа-амилазы (Mohler et al., 2014). Авторы отмечают также значимое влияние на ЧП T1BL.1RS-транслокации и гена *Rht-D1* в популяциях комбинаций Dream/Lynx и BAUB469511/Format. В обеих популяциях *Rht-D1* без T1BL.1RS-транслокации или в ее присутствии положительно влияет на ЧП (Mohler et al., 2014). Предполагается, что QTL на хромосомах 3B и 7B контролируют как УкПП, так и LMA (Cabral et al., 2014). В независимых испытаниях подтверждена локализация PhsQTLs на хромосомах 1A, 2D, 3A (2 loci), 3B, 3D, 4A (2 loci), 4D, 5D (2 loci) и 7B, а также PMA QTLs – на хромосомах 1B, 4D, 5D, 6A, 7B и 7D. Эти QTLs для ПП и LMA/PMA локализованы в отдельных локусах во всех случаях (за исключением *QPma* и *QPhs*-локусов на 4A и 5D, где возможно совпадение) (Flintham et al., 2011). Многие из генов/локусов нуждаются в валидации в различном генетическом окружении и в условиях не только типичной, но и экстремальной среды (Flintham et al., 2011). Установлено значимое различие между аллелями ГК-нечувствительного *Rht*-1 гена по влиянию на LMA экспрессию (Tan et al., 2013).

Подходы к селекции

Каждый селекционный цикл начинается с выбора источников нужных признаков и создания генетической изменчивости для последующего отбора целевых генотипов. Изучение старых и современных сортов, а также коллекционных образцов мягкой и твердой пшеницы мировой коллекции свидетельствует о том, что, несмотря на «издержки» одомашнивания, в зародышевой плазме этих видов сохранилось значительное генетическое разнообразие по УкПП, которое используется в практической селекции (Paterson et al., 1989; Lohwasser et al., 2005; Mares et al., 2005; Mori et al., 2005; Ogbonnaya et al., 2007; Fofana

et al., 2008; Liu, Bai, 2010; Беспалова и др., 2012; Мартынов, Добротворская, 2012; Добротворская, Мартынов, 2013; Yang et al., 2014a, b).

Практика показывает, что «сортообразующей» способностью обладает далеко не каждый образец. Например, в Канаде в селекции краснозерной и белозерной яровой мягкой пшеницы лучшими донорами УкПП и ЧП оказались сорта AC Domain, AC Majestic, линия RL4137 (De Pauw et al., 2012). Интересно, что названные и многие другие канадские сорта и экспериментальные линии эту замечательную способность унаследовали от бразильского сорта Frontana (Campbell, Czarnecki, 1981; De Pauw et al., 2009; Singh et al., 2012). С помощью микросателитных маркеров канадские сорта и линии разбиты в кластеры и подкластеры, различающиеся по УкПП (Fofana et al., 2008).

В Австралии донорами УкПП стали AUS1408 (белозерный ландрас из Южной Африки, содержащий основной *QPhs* на хромосоме 4A), AUS1490 и др. (Mares et al., 2005); в США – сорт Rio Blanco – для улучшения белозерной озимой мягкой пшеницы (Graybosch et al., 2013). В Поволжье среди краснозерных сортов яровой мягкой пшеницы высокий уровень УкПП показывают сорта Л503, Добрыня (Л1089), линии Л2032 и Л2033 (Крупнов и др., 2012).

Прямой отбор на УкПП в полевых условиях крайне затруднителен даже в дождливые сезоны из-за влияния на этот признак, во-первых, различий между сортами/линиями и между колосьями одного растения по фенологии, во-вторых, взаимодействия между генотипом и средой (Biddulph et al., 2007; Gerjets et al., 2010; De Pauw et al., 2012; Ikić et al., 2012). Более эффективна оценка сортов и линий в искусственных условиях. Для исследований используют колосья одной даты созревания (достижение физиологической спелости). После высушивания и обмолота определяют индекс прорастания (germination index, GI), в ряде случаев у семян учитывают также процент прорастания (percent germination, PG) (Lunn et al., 2001), устойчивость к прорастанию (germination resistance, GR) (Gordon, 1971; Knox et al., 2012), число падения (De Pauw et al., 2012). Для того чтобы оценить влияние на УкПП морфофизиологических признаков колоса, определяют индекс прорастания семян в колосе (sprouting index, SI) в лабораторных условиях или в поле (Paterson et al., 1989; Anderson et al., 1993; Trethowan, 1995; Humphreys, Noll, 2002; De Pauw et al., 2012). Если сразу после сушки семена не проращивают, во избежание выхода из покоя их хранят при температуре –20 °C (Nyachiro et al., 2002).

Для того чтобы избавиться от дефектных генов-детерминантов синдрома LMA/PMA, каждый новый цикл селекции важно начинать со скрининга родителей и более ранних поколений гомозиготных потомков. Скрининг проводится в условиях холода (около 12 °C) примерно в середине периода налива зерна (Farrell, Kettlewell, 2008; Mares, Mrva, 2008; Kondhare et al., 2012). Поскольку такие условия не каждый год встречаются в поле, оценку реакции сортов и линий на шок холодом можно провести на созревающих растениях в теплице (Mrva, Mares, 2001a; Farrell, Kettlewell, 2008; Kondhare et al., 2012) или на побегах, срезанных в поле (Mrva, Mares, 2001a).

Как прежде, так и сейчас проблема УкПП и ЧП наиболее успешно решается в селекции краснозерных сортов. Анализ данных о 1422 сортообразцах мягкой пшеницы показал тесную ассоциацию УкПП не только с окраской зерновки, но также и с устойчивостью к фузариозу колоса (Мартынов, Добротворская, 2012). И это, видимо, неслучайно: чем суровее предуборочный период (дожди, холод), тем острее проблема селекции на сочетание УкПП с устойчивостью к фузариозу колоса. Предполагается, что у твердой пшеницы QTL, контролирующий устойчивость к фузариозу колоса (QTLFHB) (DArT маркеры *wPt-2885*, *wPt-6910* и *wPt*-7400) (Ghavami et al., 2011), ассоциирован с *QPhs.spa*-5B (Singh et al., 2014). Кроме доминантных *R*-аллелей, в повышении уровня УкПП определенную положительную роль играют ГК-нечувствительные аллели *Rht*1. Однако эти аллели могут использоваться только в тех регионах, где они не оказывают отрицательного влияния на продуктивность и адаптивность пшеницы. И в селекции краснозерных сортов немало проблем. Во-первых, отбор по степени окрашивания зерна еще не означает объединения в одном генотипе всего полного набора *R*-генов и повышения уровня УкПП, во-вторых, не все сорта и линии, содержащие полный набор доминантных *R*-аллелей, характеризуются высоким уровнем УкПП.

К настоящему времени среди идентифицированных и маркированных преобладают гены/QTLs, контролирующие относительно простые признаки (устойчивость к различным болезням, реакция на фотопериод, низкорослость, качество зерна и др.) (Леонова, 2013; Хлесткина, 2013). Некоторые из этих генов/QTLs клонированы и имеют функциональные маркеры, позволяющие различать аллели в локусах (Liu et al., 2012; Liu et al., 2014). Показана возможность эффективного использования MAS (marker-assisted selection) или MAB (marker-assisted breeding) в селекции на устойчивость к патогенам, качество зерна и другие признаки (Vida et al., 2009; Dakouri et al., 2010; Randhawa et al., 2013).

Однако в селекции пшеницы на УкПП и ЧП использовать ДНК-технологии гораздо труднее. Это связано, с одной стороны, с более сложной природой признаков покоя семян и УкПП, с другой – с такими лимитирующими факторами, как ограниченный набор функциональных и тесно сцепленных диагностических маркеров, зависимость эффекта QTL от генетической среды, сильное взаимодействие QTL с внешней средой (Liu et al., 2014). Для того чтобы в селекции на УкПП опираться на MAS, необходимо, во-первых, иметь подтверждение (валидация) ассоциации «маркер – признак» в разных генофонах и разных средах, во-вторых, сосредоточиться на важнейших локусах, которые с помощью молекулярных маркеров можно контролировать в процессе селекции (Randhawa et al., 2013; Zhang et al., 2014a, b). Этим требованиям наиболее полно удовлетворяет основной QTL (основной *Phs1* ген) на хромосоме 4AL как у краснозерных, так и белозерных сортов (Kato et al., 2001; Flintham et al., 2002; Mares et al., 2005; Mori et al., 2005; Torada et al., 2008; Flintham et al., 2011; Singh et al., 2012). Известны также сообщения о валидации основных QTL на 3AS (Osa et al., 2003; Mori et al., 2005) и 2B (Muncvold et al., 2009; Chao et

al., 2010). Тонкое картирование на 2B *QPhs.cnl-2B.1* показало, что он представляет собой сцепление двух локусов с разным вкладом в УкПП (Somyong et al., 2014). С учетом особенностей QTL (основной *Phs1* ген) на хромосоме 4AL и его тесной ассоциации с Xbarc170 в Канаде он признан одним из ценнейших в селекции на УкПП краснозерных и белозерных сортов, кроме того, большое внимание уделено валидации локусов УкПП на хромосомах 1A, 1B, 5A и 7A (Randhawa et al., 2013).

В практической селекции на УкПП и ЧП весьма важен размер популяций F_2 в каждой комбинации скрещиваний (De Pauw et al., 2012), так как отбор должен быть не просто на УкПП и ЧП, а на сочетании этих генетически сложных признаков со всеми другими, не менее сложными, признаками (продуктивность, устойчивость к полеганию, толерантность/устойчивость к абио- и биострессорам). Одним из путей решения этой проблемы и избавления от обременительной работы по пересеву и изучению расщепляющихся F_2–F_5 поколений и сокращению срока создания (примерно на 2–3 года) новых сортов являются получение на растениях F_1 гаплоидов и перевод их на диплоидный уровень (doubled haploid, DH) в сочетании с использованием ДНК-технологий (Randhawa et al., 2013). Несомненно, повышение надежности молекулярных маркеров в предсказании результатов отбора во всем селекционном цикле, начиная от подбора пар для гибридизации и заканчивая мультилокационными испытаниями новых линий, ДНК-технологии станут важнейшим инструментом в повышении эффективности селекции (Леонова, 2013; Хлесткина, 2013).

В последние десятилетия достигнут прогресс в понимании генетических, биохимических и молекулярных механизмов УкПП и ЧП, идентификации, локализации и маркировании основных и минорных *QPhsR* и *QFH*, определении вклада каждого из них в уровень УкПП и ЧП у краснозерных и белозерных сортов в разных условиях внешней среды. Усовершенствованы методы измерения УкПП и ЧП, показано значение использования разных методов в раскрытии и расчленении такого генетически сложного признака, как УкПП, и его контекст-зависимости. Сокращены сроки интрогрессии желательных аллелей от неадаптивных источников в зародышевую плазму улучшаемых популяций. Заложены основы для генетически более обоснованного подбора источников/доноров УкПП и ЧП и создания более ценных гибридных популяций, пирамидирования аллелей, а также более эффективного отбора из популяций искомых потомств с помощью функциональных или тесно сцепленных молекулярных маркеров. По мере увеличения финансирования, совершенствования ДНК-технологий, удешевления фенотипирования и генотипирования, повышения воспроизводимости результатов исследования во всех звеньях селекционного цикла роль MAS в селекции пшеницы, несомненно, будет возрастать. Это позволит сократить сроки и удешевить создание новых сортов, которые должны наиболее полно отвечать современным требованиям производства пшеницы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б., Филобок В.А., Худокормова Ж.Н., Давоян Р.О., Давоян Э.Р., Карлов Г.И., Соловьев А.А., Дивашук М.Г., Майер Н.К., Дудников М.В., Мироненко Н.В., Баранова О.А. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1): 37-43.

Васильчук Н.С. Селекция яровой твердой пшеницы. Саратов, 2001.

Добротворская Т.В., Мартынов С.П. Сравнительный генеалогический анализ сортов яровой пшеницы Поволжья и Северной Америки, различающихся по устойчивости к предуборочному прорастанию. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. СПб.: ВИР, 2013;173:83-90.

Коваль С.Ф., Коваль В.С., Шаманин В.П. Изогенные линии пшеницы. Омск: Омскбланкиздат, 2001.

Козьмина Н.П. Биохимия зерна и продуктов его переработки. М., 1976.

Крупнов В.А., Антонов Г.Ю., Дружин А.Е., Крупнова О.В. Устойчивость к предуборочному прорастанию яровой мягкой пшеницы с *6Agi*(*6D*)-хромосомой от *Agropyron intermedium*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(2):444-450.

Крупнов В.А., Сибикеев С.Н., Крупнова О.В. Генетический контроль покоя и устойчивости к предуборочному прорастанию семян у пшеницы. С.-х. биология. 2010;3:3-16.

Крупнова О.В. Влияние года, Lr-транслокаций и почернения зародыша на число падения у сортов и линий яровой мягкой пшеницы. Сб. матер. регион. науч.-практ. конф. Саратов, 26–27 февр. 2009;1:135-143.

Крупнова О.В. Взаимосвязь между массой зерна и числом падения у яровой мягкой пшеницы. Докл. РАСХН. 2010;5:3-5.

Крупнова О.В., Свистунов Ю.С. Устойчивость к предуборочному прорастанию и число падения у озимой мягкой пшеницы в Поволжье. Докл. РАСХН. 2014;5:3-6.

Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. Вавиловский журнал генетики селекции. 2013;17:314-325.

Мамонтова В.Н. Селекция и семеноводство яровой пшеницы: Избр. тр. М., 1980.

Мамытова Н.С., Кузовлев В.А., Хакимжанов А.А., Фурсов О.В. Вклад различных изоферментов α-амилазы товарного зерна яровой пшеницы в формирование величины числа падения. Прикл. биохим. и микробиология. 2014;50(5):533-540.

Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Устойчивость мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к предуборочному прорастанию: Анализ ассоциаций. Генетика. 2012;48(10):1142-1152.

Прянишников А.И., Лящева С.В., Заворотина А.Д., Батищев Ю.П., Уварова В.В., Ларионова Н.Ю., Сергеева А.И. Перспективные сорта озимой пшеницы НИИСХ Юго-Востока. Сб. науч. тр. ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии. Саратов, 2009.

Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16:202-216.

Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журнал генетики селекции. 2013;17:1044-1054.

Anderson J.A., Sorrells M.E., Tanksley S.D. RFLP Analysis of genomic regions associated with resistance to preharvest sprouting in wheat. Crop Sci. 1993;33:453-459.

Bailey P.C., McKibbin R.S., Lenton J.R., Holdsworth M.J., Flintham J.E., Gale M.D. Genetic map locations for orthologous Vp1 genes in wheat and rice. Theor. Appl. Genet. 1999;98:281-284.

Barrero J.M., Mrva K., Talbot M.J., White R.G., Taylor J., Gubler F., Mares D.J. Genetic, hormonal, and physiological analysis of late maturity alpha-amylase in wheat. Plant Physiol. 2013;161:1265-1277.

Biddulph T.B., Plummer J.A., Setter T.L., Mares D.J. Influence of high temperature and terminal moisture stress on dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). Field Crops Res. 2007;103:139-153.

Biddulph T.B., Plummer J.A., Setter T.L., Mares D.J. Seasonal conditions influence dormancy and preharvest sprouting tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. Field Crops Res. 2008;107: 116-128.

Cabral A.L., Jordan M.C., McCartney C.A., You F.M., Humphreys D.G., MacLachlan R., Pozniak C.J. Identification of candidate genes, regions and markers for pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Plant Biol. 2014;14:340.

Campbell A.B., Czarnecki E. Columbus hard red spring wheat. Can. J. Plant Sci. 1981;61:147-148.

Carrari F., Perez-Flores L., Lijavetzky D., Enciso S., Sanchez R., Benech-Arnold R., Iusem N. Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize vp1. Its potential involvement in preharvest sprouting resistance. Plant Mol. Biol. 2001;45:631-640.

Chang C., Zhang H.P., Feng J.M., Yin B., Si H.Q., Ma S.X. Identifying alleles of Viviparous-1 Bassociated with pre-harvest sprouting in micro-core collections of Chinese wheat germplasm. Mol. Breeding. 2010;25:481-490.

Chang C., Zhang H.P., Zhao Q.X., Feng J.M., Si H.Q., Lu J., Ma C.X. Rich allelic variations of Viviparous-1A and their associations with seed dormancy/pre-harvest sprouting of common wheat. Euphytica. 2011;179:343-353.

Chao S., Xu S.S., Elias E.M., Faris J.D., Sorrells M.E. Identification of chromosome locations of genes affecting preharvest sprouting and seed dormancy using chromosome substitution lines in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). Crop Sci. 2010;50:1180-1187.

Clarke M.P., Gooding M.J., Jones S.A. The effects of irrigation, nitrogen fertilizer and grain size on Hagberg falling number, specific weight and blackpoint of winter wheat. J. Sci. Food Agric. 2004;84: 227-236.

Dakouri A., McCallum B.D., Walichnowski A.Z., Cloutier S. Fine-mapping of the leaf rust Lr34 locus in *Triticum aestivum* (L.) and characterization of large germplasm collections support the ABC transporter as essential for gene function. Theor. Appl. Genet. 2010;121:373-384.

De Laethauwer S., Reheul D., De Riek J., Haesaert G. *Vp1* expression profiles during kernel development in six genotypes of wheat, triticale and rye. Euphytica. 2012;188:61-70.

Dencic S., De Pauw R., Kobiljski B., Momcilovic V. Hagberg falling number and rheological properties of wheat cultivars in wet and dry preharvest periods. Plant Prod. Sci. 2013;16:342-351.

De Pauw R.M., Clarke F.R., Fofana B., Knox R., Humphreys G., Cloutier S. RL4137 contributes preharvest sprouting resistance to Canadian wheats. Euphytica. 2009;168:347-361.

De Pauw R.M., Knox R.E., Singh A.K., Fox S.L., Humphreys D.G., Hucl P. Developing standardized methods for breeding preharvest sprouting resistant wheat, challenges and successes in Canadian wheat. Euphytica. 2012;188:7-14.

Dimmock J.P.R.E., Gooding M.J. The effects of fungicides on Hagberg falling number and blackpoint in winter wheat. Crop Protection. 2002;21:475-487.

Ellis S., Biddulph B., Young K. Field assessment of pre-harvest sprouting of wheat varieties in Western Australia. http://www.regional.org.au/au/asa/2012/breeding/8413_elliss.htm

Emebiri L.C., Oliver J.R., Mrva K., Mares D.J. Association mapping of late maturity α-amylase (LMA) activity in a collection of synthetic hexaploid wheat. Mol. Breeding. 2010;26:39-49.

Evers A.D., Flintham J., Kotecha K. Alpha-amylase and grain-size in wheat. J. Cereal Sci. 1995;21:1-3.

Every D., Simmons L., Al-Hakkak J., Hawkins S., Ross M. Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. Euphytica. 2002;126:135-142.

[FAO] Food and Agriculture Organization, 2010: FAO Statistical Year Book 2010. Rome, Italy.

Farrell A.D., Kettlewell P.S. The effect of temperature shock and grain morphology on α-amylase in developing wheat grain. Annals of Botany. 2008;102:287-293.

Farrell A.D., Kettlewell P.S. The relationship between grain weight and alpha-amylase in winter wheat: varietal comparison from UK field experiments. Euphytica. 2009;168:395-402.

Farrell A.D., Kettlewell P.S., Simmonds J., Flintham J.E., Snape J.W., Werner P., Jack P.L. Control of late maturity alpha amylase in wheat by the dwarfing gene *Rht*-D1b and genes on the 1B/1R translocation. Mol. Breeding. 2013;32:425-436.

Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist. 2006;171:501-523.

Flintham J., Adlam R., Bassoi M., Holdsworth M., Gale M. Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat. Euphytica. 2002;126:39-45.

Flintham J.E., Holdsworth M.J., Jack P.L., Kettlewell P.S., Phillips A.L. An integrated approach to stabilising Hagberg Falling Number in wheat: screens, genes and understanding. Project report no. 480 submitted to HGCA. 2011.

Fofana B., Humphreys D.G., Rasul G., Cloutier S., Somers D. Assessment of molecular diversity at QTLs for preharvest sprouting resistance in wheat using microsatellite markers. Genome. 2008;51: 375-386.

Fofana B., Humphreys D.G., Rasul G., Cloutier S., Brûlé-Babel A., Woods S., Lukow O.M., Somers D.J. Mapping quantitative trait loci controlling pre-harvest sprouting resistance in a red × white seeded spring wheat cross. Euphytica. 2009;165:509-521. http://dx.doi.org/10.1007/ s10681-008-9766-6

Fox S.L., Fernandez M.R., DePauw R.M. Red smudge infection modifies sprouting response in four wheat lines. Can J. Plant Sci. 2003; 83:163-169.

Fu B.X., Hatcher D.W., Schlichting L. Effects of sprout damage on durum wheat milling and pasta processing quality. Can. J. Plant Sci. 2014;94:545-553.

Gartner B.H., Munich M., Kleijer G., Mascher F. Characterization of kernel resistance against Fusarium infection in spring wheat by baking quality and mycotoxin assessments. Europ. J. Plant Pathol. 2008;120:61-68.

Gatford K.T., Hearnden P., Ogbonnaya F.C., Eastwood R.F., Halloran G.M. Novel resistance to pre-harvest sprouting in Australian wheat from the wild relative *Triticum tauschii.* Euphytica. 2002;126:67-76.

Gerjets T., Scholefield D., Foulkes M.J., Lenton J.R., Holdsworth M.J. An analysis of dormancy, ABA responsiveness, afterripening and pre-harvest sprouting in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) caryopses. J. Exp. Bot. 2010;61:597-607.

Ghavami F., Elias E.M., Mamidi S., Ansari O., Sargolzaei M., Adhikari T., Mergoum M., Kianian S.F. Mixed model association mapping for fusarium head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat populations. G3 (Bethesda). Genes Genomes Genet. 2011;1: 209-218.

Gobaa S., Brabant C., Kleijer G., Stamp P. Effect of the 1BL·1RS translocation and of the *Glu*-B3 variation on fifteen quality tests in a doubled haploid population of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Cereal Sci. 2008;48:598-603.

Gooding M.J., Ellis R.H., Shewry P.R., Schofield J.D. Effects of restricted water availability and increased temperature on the grain filling, drying and quality of winter wheat. J. Cer. Sci. 2003;37: 295-309.

Gooding M.J. Influence of foliar diseases and their control by fungicides on grain yield and quality in wheat. Developments in Plant Breeding. Wheat Production in Stressed Environments. Springer Netherlands. 2007;12:567-581.

Gooding M.J., Uppal R.K., Addisu M., Harris K.D., Uauy C., Simmonds J.R., Murdoch A.J. Reduced height alleles (*Rht*) and Hagberg falling number of wheat. J. Cereal. Sci. 2012;55:305-311.

Gordon A.G. The germination resistance test – a new test for measuring germination quality of cereals. Can J. Plant Sci. 1971;51:181-183.

Graeber K., Nakabayashi K., Miatton E., Leubner-Metzger G., Soppe W.J. Molecular mechanisms of seed dormancy. Plant Cell Environ. 2012;35:1769-1786.

Graybosch R.A., St Amand P., Bai G. Evaluation of genetic markers for prediction of pre-harvest sprouting tolerance in hard white winter wheats. Plant Breeding. 2013;132:359-366.

Hagberg S. A rapid method for determining alpha-amylase activity. Cereal Chem. 1960;37:218-222.

Himi E., Maekawa M., Miura H., Noda K. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red grain color gene in wheat. Theor. Appl. Genet. 2011;122:1561-1576.

Himi E., Mares D.J., Yanagisawa A., Noda K. Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. J. Exp. Bot. 2002;53:1569-1574.

Himi E., Noda K. Red grain colour gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor. Euphytica. 2005;143:239-242.

Hoecker U., Vasil I.K., Mc Carty D.R. Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. Genes Dev. 1995;9:2459-2469. DOI: 10.1101/gad.9.20.2459

Hollung K., Espelund M., Schou K., Jakobsen K.S. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZip transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. Plant Mol. Biol. 1997;35:561-571.

Huang T., Qu B., Li H.-P., Zuo D.-Y., Zhao Z.-X., Liao Y.-C. A maize viviparous 1 gene increases seed dormancy and preharvest sprouting tolerance in transgenic wheat. J. Cereal Sci. 2012;55:166-173.

Humphreys D.G., Noll J. Methods for characterization of preharvest sprouting resistance in a wheat breeding program. Euphytica. 2002;126:61-65.

Ikić I., Maričević M., Tomasović S., Gunjača J., Šatović Z., Šarčević H. The effect of germination temperature on seed dormancy in Croatian-grown winter wheats. Euphytica. 2012;188:25-34.

Jacobsen J.V., Barrero J.M., Hughes T., Julkowska M., Taylor J.M., Xu Q., Gubler F. Roles for blue light, jasmonate and nitric oxide in the regulation of dormancy and germination in wheat grain (*Triticum aestivum* L.). Planta. 2013;238:21-138.

Johansson E. Effect of two wheat genotypes and Swedish environment on falling number, amylase activities, and protein concentration and composition. Euphytica. 2002;126:143-149.

Jones H.D., Peters N.C.B., Holdsworth M.J. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS1 homologue in embryos of Avena fatua. Plant J. 1997;12:911-920.

Kato K., Nakamura W., Tabiki T., Miura H., Sawada S. Detection of loci controlling seed dormancy on group 4 chromosomes of wheat and comparative mapping with rice and barley genomes. Theor. Appl. Genet. 2001;102:980-985. http://dx.doi.org/10.1007/s001220000494

Kindred D.R., Gooding M.J., Ellis R.H. Nitrogen fertilizer and seed rate effects on Hagberg falling number of hybrid wheats and their parents are associated with α-amylase activity, grain cavity size and dormancy. J. Sci. Food Agric. 2005;85:727-742.

King R.W., Richards R.A. Water uptake in relation to pre-harvest sprouting damage in wheat: ear characteristics. Aust. J. Agr. Res. 1984;35:327-336.

Knapowski T., Ralcewicz M., Barczak B., Kozera W. Effect of nitrogen and zinc fertilizing on bread-making quality of spring triticale cultivated in Noteć Valley. Polish J. Environ. Stud. 2009;18(2): 227-233.

Knox R.E., Clarke F.R., Clarke J.M., Fox S.L., DePauw R.M., Singh A.K. Enhancing the identification of genetic loci and transgressive segregants for preharvest sprouting resistance in a durum wheat population. Euphytica. 2012;186:193-206.

Kondhare K.R., Kettlewell P.S., Farrell A.D., Hedden P., Monaghan J.M. Effects of exogenous abscisic acid and gibberellic acid on pre-maturitya-amylase formation in wheat grains. Euphytica. 2012; 188:51-60.

Lemańczyk G., Kwaśna H. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat. Eur. J. Plant Pathol. 2013;135:187-200.

Liu S., Bai G. Dissection and fine mapping of a major QTL for preharvest sprouting in white wheat Rio Blanco. Theor. Appl. Genet. 2010;121:1395-1404. http://dx.doi.org/10.1007/s00122-010-1396-4 PMid:20607209

Liu S.Y., Rudd J.C., Bai G., Haley S.D., Ibrahim A.M.H., Xue Q., Hays D.B., Graybosch R.A., Devokota R.A., Amand P.S. Molecular markers linked to important genes in hard winter wheat. Crop Sci. 2014;54:1304-1321.

Liu S., Sehgal S.K., Li J., Lin M., Trick H.N., Yu J., Gill B.S., Bai G. Cloning and characterization of a critical regulator for pre-harvest sprouting in wheat. Genetics. 2013;195:263-273.

Liu Y., He Z., Appels R., Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects. Theor. Appl. Genet. 2012;125:1-10.

Lohwasser U., Roder M.S., Borner A. QTL mapping of the domestication traits pre-harvest sprouting and dormancy in wheat. Euphytica. 2005;143:247-249. http://dx.doi.org/10.1007/s10681-005-7858-0

Lunn G.D., Major B.J., Kettlewell P.S., Scott R.K. Mechanisms leading to excess α-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain in the U.K. J. Cereal Sci. 2001;33:313-329.

Mares D., Mrva K. Late-maturity α-amylase: Low falling number in wheat in the absence of preharvest sprouting. J. Cereal Sci. 2008; 47:6-17.

Mares D.J., Mrva K. Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase. Planta. 2014;240:1167-1178.

Mares D., Mrva K., Cheong J., Williams K., Watson B., Storlie E., Sutherland M., Zou Y. A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in white- and red-grained wheats of diverse origin. Theor. Appl. Genet. 2005;111:1357-1364.

Mc Carty D.R., Hattori T., Carson C.B., Vasil V., Lazar M., Vasil I.K. The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. Cell. 1991;66:895-905.

McIntosh R.A., Yamazak Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Appels R., Devos K.M. Catalogue of gene symbols for wheat. 2008. http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/

McKibbin R.S., Wilkinson M.D., Bailey P.C., Flintham J.E., Andrew L.M., Lazzeri P.A., Gale M.D., Lenton J.R., Holdsworth M.J. Transcripts of Vp-1 homologues are missspliced in modern wheat and ancestral species. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002;99:10203-10208.

Mohler V., Albrecht T., Mrva K., Schweizer G., Hartl L. Genetic analysis of falling number in three bi-parental common winter wheat populations. Plant Breeding. 2014;133:448-453.

Mori M., Uchino N., Chono M., Kato K., Miura H. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat chromosome 3A and the group 4 chromosomes, and their combined effect. Theor. Appl. Genet. 2005;110: 1315-1323.

Mousa M.A. Effect of infection by sunn of semolina quality parameters of durum wheat. J. Tikrit Univ. Agr. Sci. 2011;11(4):422-429.

Mrva K., Cheong J., Yu B., Law H.Y., Mares D. Late maturity alpha-amylase in synthetic hexaploid wheat. Euphytica. 2009;168:403-411.

Mrva K., Mares D.J. Expression of late maturity α-amylase in wheat containing gibberellic acid insensitivity genes. Euphytica. 1996;88: 68-76.

Mrva K., Mares D.J. Induction of late maturity alpha-amylase in wheat by cool temperature. Aust. J. Agric. Res. 2001a;52:477-484.

Mrva K., Mares D.J. Quantitative trait locus analysis of late maturity alpha-amylase in wheat using the doubled haploid population Cranbrook 3 Halberd. Aust. J. Agric. Res. 2001b;52:1267-1273.

Mrva K., Mares D., Cheong J. Genetic mechanisms involved in late maturity α-amylase in wheat. Eds R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. MacKay, L. McIntyre, P. Sharp. Proc. of the 11th Int. Wheat Genetics Symp. Brisbane, Sydney Univ. Press, 2008.

Munkvold J.D., Tanaka J., Benscher D., Sorrells M.E. Mapping quantitative trait loci for preharvest sprouting resistance in white wheat. Theor. Appl. Genet. 2009;119:1223-1235. http://dx.doi.org/10.1007/s00122- 009-1123-1 PMid:19669633

Nyachiro J.M., Clarke F.R., DePaw R.M., Knox R.E., Armstrong K.C. Temperature effects on seed germination and expression of seed dormancy in wheat. Euphytica. 2002;126:123-127.

Ogbonnaya F.C., Imtiaz M., De Pauw R.M. Haplotype diversity of preharvest sprouting QTLs in wheat. Genome. 2007;50:107-118.

Osa M., Kato K., Mori M., Shindo C., Torada A., Miura H. Mapping QTLs for seed dormancy and the Vp1 homologue on chromosome 3A in wheat. Theor. Appl. Genet. 2003;106:1491-1496.

Pasha I., Anjum F.M., Butt M.S., Sultan J.I. Gluten: Quality prediction and correlation studies in spring wheats. J. Food Quality. 2007; 30:438-449.

Paterson A.H., Sorrells M.E., Obendorf R.L. Methods of evaluation for preharvest sprouting resistance in wheat breeding programs. Can. J. Plant Sci. 1989;69:681-689.

Perten H. Application of the falling number method for evaluating alpha-amylase activity. Cereal Chem. 1964;41:127-139.

Randhawa H.S., Asif M., Pozniak C., Clarke J.M., Graf R. J., Fox S.L., Humphreys D.G., Knox R.E., DePauw R.M., Singh A.K., Cuthbert R.D., Hucl P., Spaner D. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. Plant Breeding. 2013;132:458-471.

Rasul G., Humphreys D.G., Brûlé-Babel A., Brûlé-Babel A., McCartney C.A., Knox R.E., DePauw R.M., Somers D.J. Mapping QTLs for pre-harvest sprouting traits in the spring wheat cross 'RL4452/AC Domain'. Euphytica. 2009;168:363-378.

Schramm E.C., Nelson S.K., Kidwell K.K., Steber C.M. Increased ABA sensitivity results in higher seed dormancy in soft white spring wheat cultivar 'Zak'. Theor. Appl. Genet. 2013;126;791-803.

Simsek S., Ohm J.B., Lu H., Rugg M., Berzonsky W., Alamri M.S., Mergoum M. Effect of pre-harvest sprouting on physicochemical changes of proteins in wheat. J. Sci. Food Agric. 2014;94:205-212.

Singh R., Hucl P., Baga M., Chibbar R.N. Validation of molecular markers for pre-harvest sprouting resistance in bread wheat. Cereal Res. Commun. 2012;40:194-203.

Singh C.B., Jayas D.S., Paliwal J., White N.D.G. Detection of sprouted and midge-damaged wheat kernels using nearinfrared hyperspectral imaging. Cereal Chem. 2009;86:256-260.

Singh A.K., Knox R.E., Clarke J.M., Clarke F.R., Singh A., DePauw R.M., Cuthbert R.D. Genetics of pre-harvest sprouting resistance in a cross of Canadian adapted durum wheat genotypes. Mol. Breeding. 2014;33:919-929.

Siuda R., Grabowski A., Lenc L., Ralcewicz M., Spychaj-Fabisiak E. Influence of the degree of fusariosis on technological traits of wheat grain. Int. J. Food Sci. Technol. 2010;45:2596-2604.

Somyong S., Ishikawa G., Munkvold J.D., Tanaka G., Benscher D., Cho Y.G., Sorrells M.E. Fine mapping by recombinant backcross populations revealed that a preharvest sprouting QTL on 2B contained two QTLs linked in coupling with different effects on the phenotype. Theor. Appl. Genet. 2014;127:1843-1855.

Tan M.-K., Koval J., Ghalayini A. Novel genetic variants of GA-insensitive *Rht-1* genes in hexaploid wheat and their potential agronomic value. PLoS ONE. 2013;8(7):e69690. DOI: 10.1371/journal.pone

Tan M.-K., Verbyla A., Cullis B., Martin P., Milgate A.W., Oliver J.R. Genetics of late maturity α-amylase in a doubled haploid wheat population. Crop Pasture Sci. 2010;61:153-161.

Torada A., Koike M., Ikeguchi S., Tsutsui I. Mapping of a major locus controlling seed dormancy using backcrossed progenies in wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome. 2008;51:426-432.

Trethowan R.M. Evaluation and selection of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) for preharvest sprouting tolerance. Austral. J. Agric. Res. 1995;46:463-474.

Tyagi S., Gupta P.K. Meta-analysis of QTLs involved in pre-harvest sprouting tolerance and dormancy in bread wheat. Triticeae Genomics Genetics. 2012;3:9-24. DOI: 10.5376/tgg.2012.03.0002

Vida G., Gál M., Uhrin A., Veisz O., Syed N.H., Flavell A.J., Wang Z., Bedo Z. Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. Euphytica. 2009;170:67-76.

Wang J.H., Pawelzik E., Weinert J., Zhao Q., Wolf G.A. Factors influencing falling number in winter wheat. Eur. Food Res. Technol. 2008;226:1365-1371.

Warner R.L., Kurdna D.A., Spaeth S.C., Jones S.S. Dormancy in white-grained mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Seed Sci. Res. 2000;10:51-60.

Whan A., Dielen A.-S., Mieog J., Bowerman A.F., Robinson H.M., Byrne K., Colgrave M., Larkin P.J., Howitt C.A., Morell M.K., Ral J.-P. Engineering α-amylase levels in wheat grain suggests a highly sophisticated level of carbohydrate regulation during development. J. Exp. Bot. 2014;65(18):5443-5457.

Xia L.Q., Yang Y., Ma Y.Z., Chen X.M., He Z.H., Roder M.S., Jones H.D., Shewry P.R. What can the Viviparous-1 gene tell us about wheat pre-harvest sprouting? Euphytica. 2009;168:385-394.

Yang J., Liu Y., Pu Z., Zhang L.Q., Yuan Z.W., Chen G.Y., Wei Y.M., Zheng Y.L., Liu D.C., Wang J.R. Molecular characterization of high pI α-amylase and its expression QTL analysis in synthetic wheat RILs. Mol. Breeding. 2014a;34:1075-1085.

Yang Y., Ma Y.Z., Xu Z.S., Chen X.M., He Z.H., Yu Z., Wilkinson M., Jones H.D., Shewry P.R., Xia L. Isolation and characterization of Viviparous-1 genes in wheat cultivars with distinct ABA sensitivity and pre-harvest sprouting tolerance. J. Exp. Bot. 2007;58: 2863-2871.

Yang Y., Zhang C.L., Liu S.X., Sun Y.Q., Meng J.Y., Xia L.Q. Characterization of the rich haplotypes of Viviparous-1A in Chinese wheats and development of a novel sequence-tagged site marker for preharvest sprouting. Mol. Breeding. 2014b;33:75-88.

Zhang J., Chen J., Bowman B.C., O'Brien K., Marshall J.M., Bonman J.M. Association mapping of Hagberg falling number in hard white spring wheat. Crop Sci. 2014a;54:1243-1252.

Zhang Y., Miao X., Xia X., He Z. Cloning of seed dormancy genes (*TaSdr*) associated with tolerance to pre-harvest sprouting in common wheat and development of a functional marker. Theor. Appl. Genet. 2014b;127:855-866.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):613-623
DOI 10.18699/VJ15.078

Факторы изменчивости мотивированной страхом реакции удаления от человека у мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН

В.С. Ланкин, С.В. Никитин, О.В. Трапезов

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

У четырех смежных поколений мини-свиней, созданных в ИЦиГ СО РАН, изучали реакцию удаления от человека в зависимости от влияния факторов наследственности и среды. Изменчивость реакции удаления определяли в четырех гетеротипных условиях тестирования, включавших в качестве стандартного аверсивного стимула присутствие человека при кормлении животных «в группе» или «индивидуально» после 14–16 или 2 ч пищевой депривации. Все изученные факторы ранжируются по относительному вкладу в общую фенотипическую изменчивость этой реакции в следующем порядке: пол (0,0–0,4 %), возраст (0,1–4,7 %), зоосоциальная изоляция (0,1–2,1 %), тип окраски (2,9–7,8 %), генотип хряков (10,8 %), пищевая мотивация (6,1–12,8 %) и взаимодействие «генотип – пищевая мотивация» (2,7–56,4 %). Впервые показано существование у мини-свиней наследственного полиморфизма этой адаптивной реакции, включающего три класса поведенческих фенотипов. Пол и возраст не влияют на реакцию удаления у поросят в период с 1,5 мес. до полового созревания. Установлено, что возрастные изменения поведения у свиноматок зависят от косвенного отбора особей спокойного фенотипа, частота которого увеличивается у них до 63 %, по сравнению с 29 % у ремонтного молодняка. Социальная изоляция и пищевая мотивация достоверно влияют на проявление этой реакции у поросят в возрасте 1,5 и 4,1 мес. и не влияют на нее у свиноматок в возрасте 10,4 и 22,5 мес. Неблагоприятным следствием средовых влияний пищевой мотивации и ее взаимодействия является высокая вариабельность (CV в пределах 95–120 %) реакции удаления. Полученные результаты необходимы для развития исследований по генетике пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку и коррекции метода определения этого селективно значимого поведения у мини-свиней ИЦиГ СО РАН.

Ключевые слова: мини-свиньи; реакция удаления от человека; факторы среды; взаимодействие «генотип – среда»; тип окраски.

Factors contributing to the variation of the fearful withdrawal response to humans in minipigs bred at ICG SB RAS

V.S. Lankin, S.V. Nikitin, O.V. Trapezov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The fearful withdrawal response to humans was studied with regard to the effect of hereditary and environmental factors in four consecutive generations of minipigs bred at the Institute of Cytology and Genetics. Variation in the withdrawal response was tested in four heterotypic settings. The standard aversive stimulus was the presence of a human as the animals were being given food either as a group or one by one after 14–16 or 2 h of food deprivation. All factors studied are ranged with regard to their contributions to the overall phenotypic variation of the response as follows: sex (0.0–0.4 %), age (0.1–4.7 %), social isolation (0.1–2.1 %), colour types (2.9–7.8 %), boar genotype (10.8 %), food motivation (6.1–12.8 %), and the genotype–food motivation interaction (2.7–56.4 %). That was the first demonstration of hereditary polymorphism of this behavioral reaction in minipigs, which includes three classes of behavioral phenotypes. Sex and age do not affect the withdrawal response in piglets from 1.5-month age to 4.1-month age. It was found that the age-related changes in the behavior of sows depend on the indirect selection of individuals with a quiet phenotype, and the frequency of this phenotype increases from 29 % (the rearing stock) to 63 %. Social isolation and food motivation significantly influence the response in piglets at ages of 1.5 and 4.1 months, but not in sows at ages of 10.4 and 22.5 months. An adverse consequence of the environmental influence of food motivation and its interaction is a broad variability (CV 95–120 %) of the withdrawal response. The results will contribute to the study of the genetics of the fearful-defensive response to humans and to correction of the method for evaluating this behavior, valuable for breeding, in ICG minipigs.

Key words: minipigs; human withdrawal response; environmental factors; genotype – environment interaction; coat colour.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Ланкин В.С., Никитин С.В., Трапезов О.В. Факторы изменчивости мотивированной страхом реакции удаления от человека у мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):613-623. DOI 10.18699/VJ15.078

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Lankin V.S., Nikitin S.V., Trapezov O.V. Factors contributing to the variation of the fearful withdrawal response to humans in minipigs bred at ICG SB RAS. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):613-623. DOI 10.18699/VJ15.078

УДК 636.4:636.066
Поступила в редакцию 26.05.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: lankin@bionet.nsc.ru

Миниатюрные (мини-) свиньи представляют новый вид лабораторных животных, роль которых в качестве модельного объекта для медико-биологических исследований в последние годы существенно выросла (Lind et al., 2005; Ашуев и др., 2007; Тихонов, 2010; Sondergaard et al., 2012; Christoffersen et al., 2013; Никитин, 2014). Неслучайно поэтому проводится детальное изучение анатомо-морфологических, физиологических, биохимических и иммунологических признаков у мини-свиней отечественных и зарубежных пород, необходимое для накопления базальных сведений о биологии этих животных (Капанадзе, Ашуев, 2007; Simianer, Kohn, 2010; Тихонов, 2010; Станкова, Капанадзе, 2012). Однако сведения об эмоциональном поведении мини-свиней, в частности мотивированном страхом к незнакомому человеку, определяющему возможность их оптимального использования в экспериментах, практически отсутствуют (Kohn et al., 2009).

Литературные сведения о поведении мини-свиней ограничиваются данными, полученными на животных геттингенской породы. Известны несколько работ по изучению у них способности к дискриминантному обучению, спонтанного поведения и привыкания к производственным контактам с человеком, выполненных на небольшом числе животных (Tanida, Nagana, 1998; Tsutsumi et al., 2001; Lind et al., 2005; Sondergaard et al., 2007, 2012). Получены предварительные данные по сравнительному изучению у мини-свиней ИЦиГ СО РАН эмоционального поведения в тесте «открытое поле» и реакции удаления от человека, подтвердившие, во-первых, мотивационную обусловленность этой реакции страхом к человеку и, во-вторых, ее взаимосвязь с разнообразием окрасок (Ланкин, Буиссу, 2001; Kulikov et al., 2014). Более детальные сведения о поведении мини-свиней ИЦиГ отсутствуют.

Существенным препятствием к изучению у мини-свиней пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку, главным компонентом которого является мотивированная страхом реакция избегания/удаления от человека, оказывается отсутствие надежного метода его определения. За исключением анекдотического глазомерного (визуального) способа выявления темперамента у мини-свиней (Шатохин и др., 2013), среди большого числа этологических методов известен только один, разработанный специально для этих животных (Forkman et al., 2007; Kohn et al., 2009). Однако авторы последнего указывают на существующие у него значительные недостатки (низкие специфичность и точность) и подчеркивают необходимость создания более надежного и стандартизированного метода.

Важное значение для объективного определения фено- и генотипического разнообразия пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку имеет задача изучения факторов его внутрипородной изменчивости у мини-свиней ИЦиГ. Особый интерес при этом представляет выяснение роли в регуляции этого поведения пищевой мотивации, линейно связанной со скоростью роста, сниженной у мини-свиней в результате длительной селекции на низкую живую массу в 10–15 раз, по сравнению с нормальными свиньями заводских пород (Rauw et al., 1998; Тихонов, 2010; Simianer, Kohn, 2010). У разных видов продуктивных животных усиление пищевой мотивации является ведущим фактором возрастного угашения реакции страха и формирования адаптивного поведения по отношению к человеку (Ланкин, 1997; Ланкин и др., 2007). Известно также, что взаимодействие «генотип – пищевая мотивация» является существенным источником средовой (модификационной) изменчивости этого поведения, маскирующей фенотипическое проявление его генотипического разнообразия у свиней заводских линий (Ланкин, 2013). Можно поэтому ожидать, что заметным результатом селекционного снижения пищевой мотивации у мини-свиней должно быть, во-первых, уменьшение / отсутствие у них возрастных изменений в оборонительном поведении, ведущих к увеличению частоты особей спокойного фенотипа у продуктивных животных. Другим ожидаемым результатом может быть снижение / исключение неблагоприятных влияний взаимодействия «генотип – пищевая мотивация», являющегося обычной причиной получения смещенных индивидуальных оценок поведения и их низкой повторяемости (Фолконер, 1985; Ланкин, 2013).

Цель настоящей работы – сравнительное качественное и количественное исследование внутри- и межгрупповой изменчивости реакции удаления от человека в зависимости от влияния факторов наследственности и среды у четырех смежных поколений мини-свиней, представляющих генеральную совокупность этих уникальных животных, созданных в Институте цитологии и генетики СО РАН.

Материалы и методы

Животные и экспериментальные условия. Исследования проводили на 6 разных по полу и возрасту группах мини-свиней, находившихся на экспериментальной свиноферме ЦКП ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Отобранное по продуктивности поголовье состояло из 22 свиноматок в возрасте 22,5 мес. (2011 года рождения) и 28 свиноматок в возрасте 10,4 мес. (2012 года рождения). Начиная с поколения 2011-го года рождения свиноматок отбирали по живой массе и по репродуктивным качествам (оплодотворяемость, многоплодие, сохранность поросят к отъему). Отбор мини-свиней по поведению не проводился. Неотобранный по продуктивности ремонтный молодняк включал 27 свинок и 23 хрячка в возрасте 4,1 мес. (2013 года рождения), а также 53 свинки и 55 хрячков в возрасте 1,5 мес. (2014 года рождения). Свинок и хрячков в возрасте 1,5 мес. тестировали по поведению через 2 нед после отъема от матерей и завершения перехода на самостоятельное кормление. Животные 2014 года рождения происходили от родителей (22 свиноматки и 9 хряков) с известным фенотипом поведения.

Свинок и хрячков содержали в изолированных стандартных клетках (235 × 195 × 90 см) группами по 5–6 голов. Свиноматок и поросят кормили в 8:30 и 17:00 по нормам стандартного рациона.

Этологические тесты. Поведение изучали с помощью стандартного метода определения мотивированной страхом реакции удаления от человека у разных видов животных в производственных условиях (Ланкин, Буиссу, 2001). Тестирование мини-свиней всех возрастов проводили в их

«домашних клетках», в условиях свободного поведения, исключающих проявление у них межвидовой агрессии по отношению к человеку. Всех животных тестировали 4 раза. Первое и второе тестирования (I тест «в группе») проводили на животных, находившихся в группе (по 3–4 особи) сверстников, сначала после 14–16 ч пищевой депривации и спустя 3–4 дня после 2 ч пищевой депривации. Третье и четвертое тестирования (тест II «индивидуально») проводили по той же технике, но уже на индивидуальных животных, в условиях кратковременной изоляции от сверстников.

Каждое тестирование выявляет у мини-свиней с заданным уровнем пищевой мотивации «частное» разнообразие фенотипов реакции удаления, отличающихся по числу отметок подходов к корму в присутствии незнакомого человека. Спокойные животные, без реакции удаления от человека, ели корм в течение всего времени тестирования (9–12 мин в тесте I и 3–5 мин в тесте II) и получали три отметки краской на спине. Трусливые особи сразу удалялись от экспериментатора и не получали таких отметок. Особи с промежуточным между этими контрастными фенотипами поведением получали 1 или 2 отметки. Все тестирования проводились между 9:00 и 13:00 в одинаковой последовательности тестов одним и тем же экспериментатором.

Качественные и количественные характеристики поведения. Структуру подопытных групп мини-свиней по реакции удаления характеризовали частными распределениями частот 4 фенотипов по 3 классам: двум крайним с отметкой 3 или 0 и среднему классу фенотипов промежуточного поведения с 1 или 2 отметками по выраженности у них этой реакции. Для количественного изучения использовали балл (= число отметок) по реакции удаления у индивидуальных животных.

Факторы наследственности. Наследственную обусловленность реакции удаления у мини-свиней оценивали дисперсионным анализом влияния разных по фенотипу поведения производителей, условно обозначенных как фактор «генотип хряка», на изменчивость этой реакции у их потомков 2014 года рождения. Отбор хряков по свойствам оборонительного реагирования на человека не проводили: 5 из них были спокойного, 2 – трусливого и 2 – промежуточного фенотипов поведения.

Влияние на изменчивость реакции удаления существующего у мини-свиней наследственного разнообразия четырех основных типов окраски – белой, черной, черно-пестрой и агути (Тихонов, 2010) – также оценивали дисперсионным анализом.

Факторы среды. Влияние пола, возраста и типа окраски на реакцию удаления определяли сравнением качественных и количественных показателей ее изменчивости у отличающихся по данным признакам групп мини-свиней.

Уровень пищевого возбуждения/мотивации и эмоционального стресса у мини-свиней формировали контролируемым действием на них пищевой (14–16/2 ч) и социальной (3–5 мин) депривации. Оба воздействия являются обычными элементами этологических тестов, влиянием которых часто пренебрегают (Forkman et al., 2007). В нашем эксперименте попарные сравнения четырех частных распределений реакции удаления позволяют оценить простое и комбинированное влияние этих факторов среды на изменчивость данной реакции у подопытных групп мини-свиней.

Для обнаружения влияний взаимодействия «генотип – пищевая мотивация» проводили сравнение первого и четвертого тестирований реакции удаления у мини-свиней всех подопытных групп (Ланкин, 2013).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Частные распределения сравнивали с помощью критерия идентичности (I) (Животовский, 1991), внутриклассовые частоты – с помощью 2 × 2 таблиц (*d.f.* = 1). Статистическую значимость влияния учтенных факторов определяли дисперсионным анализом, достоверность различий средних величин – по критерию Стьюдента. Достоверность влияния взаимодействия «генотип – пищевая мотивация» оценивали двухфакторным дисперсионным анализом действия фактора «средний генотип», учитывающего генотипическую разнородность особей в крайних классах анализируемых первого и четвертого распределений, и фактора «пищевая мотивация», представляющего ее комбинированное со стрессом социальной изоляции влияние на изменчивость реакции удаления у животных (Ланкин, 2013). Все этапы обработки данных проводили по пакету прикладных программ STATISTICA 6.1 для Windows.

Результаты

Наследственная обусловленность полиморфизма реакции удаления. Разнообразие реакции удаления от человека существует у мини-свиней всех изученных групп (табл. 1). Диапазон внутригрупповой изменчивости этой реакции включает три известных класса поведенческих фенотипов и не зависит от влияния факторов среды. Наследственную обусловленность наблюдаемого разнообразия реакции удаления доказывает его достоверная зависимость у самок и самцов в возрасте 1,5 мес. от генотипов хряков (табл. 2, дисперсионный комплекс I).

Влияние пола, возраста и кратковременной социальной изоляции. В период до половой зрелости (6 мес.) изменчивость реакции удаления у самок и самцов мини-свиней не зависит от их пола (табл. 2, комплексы I, Iа). Возраст также достоверно не влияет на изменчивость этой реакции у неполовозрелых поросят (табл. 2, комплекс Iб). Это предполагает возрастную стабильность индивидуального проявления реакции удаления у молодняка мини-свиней в отмеченный период онтогенеза. В подтверждение такого заключения выясняется, что средняя величина этой реакции в тестах I и II практически совпадает у ремонтных самок и самцов обоих поколений.

Возраст является достоверным фактором изменчивости реакции удаления у свиноматок, ведущим к увеличению у них концентрации спокойного (с отметкой 3) фенотипа (табл. 1, 2, комплекс Iв). Особенностью возрастных изменений поведения у свиноматок оказывается «скачкообразное» увеличение частоты этого фенотипа, не пропорциональное их различиям в возрасте. Так, по сравнению с молодняком в возрасте 4,1 мес., увеличение частоты спокойного фенотипа при тестировании «в группе» у свиноматок младшего поколения (в возрасте 10,4 мес.)

Таблица 1. Изменчивость реакции удаления от человека у мини-свиней в разной среде этологических тестирований

Пол, возраст (*n*)	Среда тестов		Частные распределения (%) фенотипов по классам реакции удаления			За одно тестирование	За тесты I и II
	Пищевая депривация, ч	Социальный контекст	3	1 или 2	0	$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$ $CV \pm s_{CV}$, %
Ремонтное поголовье							
Самки, 1,5 мес. (53)	14–16	В группе	47,2	17,0	35,8	1,6 ± 0,19	1,1 ± 0,13
	2		15,1	7,5	77,4	0,6 ± 0,15	123,4 ± 11,98
	14–16	Индивидуально	20,8	9,4	69,8	0,8 ± 0,17	0,7 ± 0,12
	2		20,8	5,7	73,6	0,7 ± 0,17	175,9 ± 17,08
	Эффект среды: Δ(1-4)[1]		26,4**	11,3	–37,8**	0,9***	0,4*
Самцы, 1,5 мес. (55)	14–16	В группе	54,5	9,1	36,4	1,8 ± 0,19	1,3 ± 0,14
	2		21,8	12,7	65,5	0,8 ± 0,17	109,1 ± 10,39
	14–16	Индивидуально	25,5	9,1	65,5	0,9 ± 0,18	0,8 ± 0,12
	2		21,8	12,7	65,5	0,8 ± 0,17	157,2 ± 14,98
	Эффект среды: Δ(1-4)		32,7**	–3,6	–29,1**	1,0***	0,5*
Самки и самцы, 1,5 мес. (108)	14–16	В группе	50,9	13,0	36,1	1,7 ± 0,14	1,2 ± 0,09
	2		18,5	10,2	71,3	0,7 ± 0,11	115,8 ± 7,88
	14–16	Индивидуально	23,1	9,3	67,6	0,8 ± 0,12	0,8 ± 0,08
	2		21,3	9,3	69,4	0,7 ± 0,12	155,2 ± 10,56
	Эффект среды: Δ(1-4)		29,6**	3,7	–33,3**	1,0***	0,4**
Самки, 4,1 мес. (27)	14–16	В группе	44,4	22,2	33,3	1,7 ± 0,26	1,4 ± 0,18
	2		25,9	29,6	44,4	1,1 ± 0,24	94,6 ± 9,10
	14–16	Индивидуально	37,0	25,9	37,0	1,4 ± 0,26	1,0 ± 0,18
	2		18,5	7,4	74,1	0,6 ± 0,23	131,7 ± 12,68
	Эффект среды: Δ(1-4)		25,9*	14,8	–40,8**	1,1**	0,4
Самцы, 4,1 мес. (23)	14–16	В группе	34,8	13,0	52,2	1,2 ± 0,29	1,3 ± 0,20
	2		30,4	21,7	47,8	1,3 ± 0,28	105,6 ± 11,01
	14–16	Индивидуально	21,7	39,1	39,1	1,1 ± 0,24	0,9 ± 0,18
	2		21,7	0,0	78,3	0,7 ± 0,26	135,8 ± 14,16
	Эффект среды: Δ(1-4)		13,1	13,0	–26,1*	0,5	0,4
Самки и самцы, 4,1 мес. (50)	14–16	В группе	40,0	18,0	42,0	1,5 ± 0,20	1,3 ± 0,13
	2		28,0	26,0	46,0	1,2 ± 0,18	103,3 ± 7,31
	14–16	Индивидуально	30,0	32,0	38,0	1,3 ± 0,18	1,0 ± 0,13
	2		20,0	4,0	76,0	0,6 ± 0,17	127,1 ± 8,99
	Эффект среды: Δ(1-4)		20,0*	14,0	–34,0**	0,9***	0,3
Самки и самцы, 1,5 и 4,1 мес. (158)	14–16	В группе	47,5	14,6	38,0	1,6 ± 0,11	1,2 ± 0,08
	2		21,5	15,2	63,3	0,9 ± 0,10	114,6 ± 4,53
	14–16	Индивидуально	25,3	16,5	58,2	1,0 ± 0,10	0,8 ± 0,07
	2		20,9	7,6	71,5	0,7 ± 0,10	156,5 ± 6,23
	Эффект среды: Δ(1-4)		26,6**	7,0	–33,5**	0,9***	0,4***
Отселектированное поголовье							
Самки, 10,4 мес. (28)	14–16	В группе	82,1	14,3	3,6	2,6 ± 0,16	2,5 ± 0,13
	2		67,9	21,4	10,7	2,3 ± 0,21	39,6 ± 3,74
	14–16	Индивидуально	71,4	17,9	10,7	2,4 ± 0,20	2,3 ± 0,15
	2		67,9	14,3	17,9	2,2 ± 0,23	49,7 ± 4,70
	Эффект среды: Δ(1-4)		14,2	0,0	–14,3	0,4	0,2

Окончание таблицы 1.

Пол, возраст (*n*)	Среда тестов		Частные распределения (%) фенотипов по классам реакции удаления			За одно тестирование	За тесты I и II
	Пищевая депривация, ч	Социальный контекст	3	1 или 2	0	$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$ $CV \pm s_{CV}$, %
Самки, 22,5 мес. (22)	14–16	В группе	50,0	9,1	40,9	1,6 ± 0,31	1,6 ± 0,21
	2		40,9	31,8	27,3	1,6 ± 0,28	85,6 ± 9,13
	14–16	Индивидуально	68,2	22,7	9,1	2,3 ± 0,23	2,0 ± 0,19
	2		40,9	27,3	31,8	1,6 ± 0,28	62,4 ± 6,65
	Эффект среды: Δ(1-4)		9,1	–18,2	9,1	0,0	–0,4
По всем самкам (50)	14–16	В группе	68,0	12,0	20,0	2,2 ± 0,18	2,1 ± 0,12
	2		56,0	26,0	18,0	2,0 ± 0,17	59,3 ± 4,19
	14–16	Индивидуально	70,0	20,0	10,0	2,4 ± 0,15	2,2 ± 0,12
	2		56,0	20,0	24,0	2,0 ± 0,18	54,3 ± 3,84
	Эффект среды: Δ(1-4)		12,0	–8,0	–4,0	0,2	–0,1

[1] Эффект среды, включающий комплементарное действие пищевой мотивации и эмоционального стресса изоляции на оборонительное поведение, оценивали разностью параметров распределений, обнаруженных в первом и четвертом тестированиях. *n* – объем выборки; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

составило 42,1 % ($p < 0,05$), а у свиноматок старшего поколения (в возрасте 22,5 мес.) – 10,0 % ($p > 0,05$) и уже 29,5 % ($p < 0,05$) при тестировании «индивидуально».

Причиной резкого прироста частоты спокойного фенотипа у свиноматок младшего поколения является косвенный отбор таких особей действием проводившейся только среди них селекции по репродуктивным качествам. Другим интересным результатом возрастных изменений поведения оказывается смена знака разности между частотами крайних (спокойного и трусливого) фенотипов: с отрицательного у ремонтного молодняка на положительный у свиноматок обоих поколений.

Социальная изоляция достоверно влияла на проявление реакции удаления у ремонтных самок и самцов в обоих возрастах (табл. 2, комплексы I, Iа). В возрасте 1,5 мес. средний балл этой реакции снизился в тесте II, по сравнению с тестом I, у самок – на 36,4 % ($p < 0,05$) и у самцов – на 38,5 % ($p < 0,05$). Однако в возрасте 4,1 мес. сходное снижение среднего балла на 28,6 и 30,8 % соответственно было недостоверным, возможно, из-за меньшей численности животных. Социальная изоляция не влияла на экспрессивность реакции удаления у свиноматок обоих поколений.

Эмоциональный стресс изоляции достоверно усиливает изменчивость реакции удаления у мини-свиней. Так, по сравнению с «фоновой» вариацией этой реакции при тестировании «в группе» (CV в пределах 95–120 %), ее коэффициент вариации в тесте II увеличился у самок и самцов в возрасте 1,5 мес. в среднем на 34,0 % ($p < 0,01$) и в 4,1 мес. – на 23,0 % ($p < 0,05$). Увеличение объема выборки при объединении поросят двух поколений не снижает вариабельность реакции удаления.

Влияние пищевой мотивации. Снижение пищевой мотивации во втором тестировании, по сравнению с первым, достоверно влияет на изменчивость и на распределение частот фенотипов реакции удаления у самок (I = 19,9; *d.f.* = 2; $p < 0,001$) и самцов (I = 13,0; *d.f.* = 2; $p < 0,01$) в возрасте 1,5 мес. (табл. 2, комплекс Iг). Более того, простое действие этого фактора оказывается равносильным его комбинированному со стрессом изоляции влиянию: средняя величина реакции удаления у поросят не изменяется со второго по четвертое тестирование (табл. 1). Однако начиная с возраста 4,1 мес. изменчивость этой реакции у самок и самцов уже не зависит от простого действия ($F(1/98) = 0,80$; $p > 0,05$) пищевой мотивации. Тем не менее она достоверно зависит от ее комбинированного со стрессом изоляции действия при третьем и четвертом тестированиях (табл. 2, комплекс Iд).

Поведение свиноматок обоих возрастов не зависит от простого действия ($F(1/98) = 0,57$; $p > 0,05$) пищевой мотивации и с пограничной достоверностью ($F(1/98) = 3,28$; $p = 0,073$) зависит от ее комбинированного с изоляцией действия.

У мини-свиней, так же как и у других видов животных, регуляторное влияние пищевой мотивации отрицательно взаимосвязано с вызываемыми им направленными и обратимыми изменениями в проявлении реакции удаления (Козловская, 1974; Ланкин, 1997, 2013). Бисериальный коэффициент корреляции между уровнем пищевой мотивации и баллом этой реакции в каждом из четырех тестирований у поросят в возрасте 1,5 мес. был равен 0,658 ($p < 0,05$; N = 12) и в 4,1 мес. 0,671 ($p < 0,05$; N = 12). Эта закономерная регуляторная взаимосвязь максимально выражена 0,951 ($p < 0,001$; N = 12) у всех поросят при первом и четвертом тестированиях, однако с возрастом становится недостоверной 0,455 ($p > 0,05$; N = 12) у свиноматок.

Влияние взаимодействия «генотип – пищевая мотивация». Частные распределения частот фенотипов реакции удаления при первом и четвертом тестированиях различались между собой у самок (I = 16,1; *d.f.* = 2; $p < 0,001$) и самцов (I = 13,0; *d.f.* = 2; $p < 0,01$) в возрасте

Таблица 2. Факторы изменчивости реакции удаления от человека у мини-свиней

Факторы вариации	Степени свободы	Средний квадрат	Сила влияния, %	F	*p*
I. Изменчивость индивидуальных отметок реакции удаления. Самки и самцы в возрасте 1,5 мес.					
1. Генотип хряка	2	41,31	10,8	26,62	0,001
2. Пол	1	3,18	0,4	2,05	нд
3. Социальная изоляция	1	9,52	1,2	6,13	0,050
Ошибка	420	1,55	85,1	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	11	9,55	13,7	6,15	0,001
Iа. Самки и самцы в возрасте 4,1 мес.					
1. Пол	1	1,22	0,4	0,71	нд
2. Социальная изоляция	1	7,20	2,1	4,19	0,042
Ошибка	196	1,72	97,6	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	3	2,83	2,4	1,63	нд
Iб. Самки и самцы в возрасте 1,5 и 4,1 мес.					
1. Пол	1	0,58	0,0	0,36	нд
2. Возраст	1	1,11	0,1	0,68	нд
3. Социальная изоляция	1	19,67	1,8	12,10	0,001
4. Тип окраски	3	10,89	2,9	6,70	0,001
Взаимодействие: 2×4	3	9,17	2,5	5,64	0,001
Ошибка	600	1,63	87,5	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	31	3,40	9,5	2,09	0,001
Iв. Свиноматки двух поколений					
1. Возраст (= селекционное поколение)	1	8,72	3,0	6,79	0,010
3. Социальная изоляция	1	0,33	0,1	0,26	нд
2. Тип окраски	3	7,65	7,8	5,95	0,001
Ошибка	184	1,28	80,1	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	15	3,01	15,3	2,35	0,050
Iг. Самки и самцы в возрасте 1,5 мес.					
1. Пол	1	2,72	0,7	1,60	нд
2. Пищевая мотивация	1	53,04	12,8	31,28	0,001
Ошибка	212	1,70	86,6	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	3	55,80	13,4	18,60	0,001
Iд. Самки и самцы в возрасте 4,1 мес.					
1. Пол	1	0,70	0,4	0,45	нд
2. Пищевая мотивация + стресс изоляции	1	9,70	6,1	6,29	0,014
Ошибка	96	1,54	92,5	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	3	3,77	7,1	2,45	нд
Iе. Самки и самцы в возрасте 1,5 мес.					
1. Генотип хряка[1]	1	2,92	0,7	1,80	нд
2. Тип окраски	3	3,22	2,3	1,99	нд
Взаимодействие: 1×2	3	7,32	5,3	4,51	0,004
Ошибка	208	1,62	81,3	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	7	4,93	8,3	3,04	0,010
II. Межгрупповое разнообразие частот фенотипов двух крайних классов реакции удаления. Самки и самцы в возрасте 1,5 мес.					
1. «Средний генотип»	1	838,34	21,6	111,51	0,001
2. Среда 1-го и 4-го тестирований	1	11,02	0,3	1,47	нд
Взаимодействие: 1×2	1	2 973,60	76,6	395,51	0,001
Ошибка	8	7,52	1,5	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	3	1 274,32	98,4	169,46	0,001

Окончание таблицы 2.

Факторы вариации	Степени свободы	Средний квадрат	Сила влияния, %	F	*p*
II а. Самки и самцы в возрасте 4,1 мес.					
1. «Средний генотип»	1	2 596,02	50,8	86,85	0,001
2. Среда 1-го и 4-го тестирований	1	146,30	2,9	4,89	0,058
Взаимодействие: 1 × 2	1	2 130,67	41,7	71,28	0,001
Ошибка	8	29,89	4,7	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	3	1 624,33	95,3	54,34	0,010
II б. Самки и самцы в возрасте 1,5 и 4,1 мес.					
1. «Средний генотип»	1	3 192,43	35,5	170,67	0,001
2. Возраст	1	0,17	0,0	0,01	нд
3. Среда 1-го и 4-го тестирований	1	118,82	1,3	6,35	0,050
Взаимодействие: 1 × 2	1	241,93	2,7	12,93	0,010
1 × 3	1	5 069,23	56,4	271,00	0,001
Ошибка	16	18,71	3,3	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	7	1 242,30	96,7	66,40	0,001
II в. Свиноматки двух поколений					
1. «Средний генотип»	1	4 282,74	69,2	20,39	0,010
2. Среда 1-го и 4-го тестирований	1	56,77	0,9	0,27	нд
Взаимодействие: 1 × 2	1	165,02	2,7	0,79	нд
Ошибка	8	210,01	27,2	нет	нет
Суммарное факториальное влияние	3	1 501,51	72,8	7,15	0,050

[1] Из-за отсутствия у потомков белой окраски отцов с трусливым фенотипом (0 отметок), градации по хрякам трусливого и промежуточного (1 или 2 отметки) фенотипов были объединены. Недостоверные взаимодействия факторов опущены. Силу влияния оценивали по Плохинскому; нд – недостоверно.

1,5 мес., у самок (I = 9,5; *d.f.* = 2; $p < 0,01$) и самцов (I = 7,9; *d.f.* = 2; $p < 0,05$) в возрасте 4,1 мес. и достоверно не различались у свиноматок в обоих возрастах (табл. 1). Так же, как у нормальных продуктивных свиней, у молодняка мини-свиней усиление пищевого возбуждения при первом тестировании повышает частоту спокойного фенотипа до максимального значения и снижает частоту трусливого фенотипа до минимального значения (Ланкин, 2013). Действие сниженного пищевого возбуждения было противоположным.

Достоверную зависимость представленных изменений реакции удаления у ремонтного молодняка от влияния взаимодействия «генотип – пищевая мотивация» доказывают результаты дисперсионного анализа (табл. 2, комплексы II, IIа). Относительный вклад (сила влияния) данного взаимодействия в общую фенотипическую изменчивость этой реакции был максимальным (76,6 %) у поросят в возрасте 1,5 мес., затем снизился до 41,7 % к 4,1 мес. и стал недостоверным у свиноматок обоих возрастов (табл. 2, комплекс IIв). Снижение силы влияния данного взаимодействия совпадает с достоверным уменьшением в среднем более чем в 2 раза коэффициента вариации реакции удаления у свиноматок.

Повторяемость реакции удаления. Возрастное снижение влияния взаимодействия «генотип – пищевая мотивация» сопровождается увеличением более чем в 3 раза вкладов различий «средних генотипов» у особей двух крайних классов реакции удаления (табл. 2, комплексы II–IIв). Этот факт предполагает возраст-зависимое увеличение повторяемости реакции удаления, тем не менее, остававшейся практически одинаковой у самок и самцов в возрасте 1,5 мес. – 0,527 ($p < 0,001$; N = 108), в 4,1 мес. – 0,490 ($p < 0,001$; N = 50) и 0,494 ($p < 0,001$; N = 50) – у свиноматок обоих возрастов. Обнаруженные значения повторяемости указывают на постоянное низкое фенотипическое проявление (24–28 %) генотипических различий по реакции удаления от человека у мини-свиней разного возраста.

Влияние типа окраски. Разнообразие реакции удаления присутствует «внутри» каждого основного типа окраски (белая, черно-пестрая, черная, агути) у мини-свиней (табл. 3). Диапазон такой «внутриокрасочной» изменчивости не отличается от обнаруженного у объединенных по типу окраски мини-свиней. Оказывается также, что дискретное разнообразие четырех окрасочных фенотипов является достоверным фактором внутригрупповой изменчивости реакции удаления у мини-свиней разного возраста (табл. 2, комплексы Iб, в).

Тип окраски связан с разной реактивностью поросят к социальной изоляции, изменяющейся у них с возрастом (табл. 2, комплекс Iб). Так, у особей в возрасте 1,5 мес. стрессовая реакция на изоляцию была достоверно выраженной только у поросят белой окраски; у них средний балл реакции удаления при тестировании «индивидуаль-

Таблица 3. Изменчивость реакции удаления от человека у мини-свиней разных типов окраски

Тип окраски (число наблюдений)[1]	Тестирование	Частные распределения (%) фенотипов по классам реакции удаления			$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$	$CV \pm s_{CV}$
		3	1 или 2	0		
Ремонтное поголовье						
Самки самцы в возрасте 1,5 мес.						
Белая (102)	1-е и 2-е	44,1	15,7	40,2	1,5 ± 0,14	94,3 ± 6,60
	3-е и 4-е	28,4	13,7	57,8	1,0 ± 0,13	131,3 ± 9,19
Черно-пестрая (42)	1-е и 2-е	23,8	2,4	73,8	0,7 ± 0,20	185,1 ± 20,18
	3-е и 4-е	16,7	2,4	81,0	0,5 ± 0,17	220,3 ± 24,02
Черная (52)	1-е и 2-е	17,3	7,7	75,0	0,6 ± 0,16	192,3 ± 18,85
	3-е и 4-е	9,6	5,8	84,6	0,3 ± 0,13	312,4 ± 30,63
Агути (20)	1-е и 2-е	55,0	20,0	25,0	2,0 ± 0,29	64,8 ± 10,25
	3-е и 4-е	35,0	10,0	55,0	1,2 ± 0,32	119,2 ± 18,86
Самки самцы в возрасте 4,1 мес.						
Белая (46)	1-е и 2-е	43,5	19,6	36,9	1,6 ± 0,20	84,8 ± 8,84
	3-е и 4-е	21,7	30,4	47,8	1,2 ± 0,19	107,4 ± 11,20
Черно-пестрая (14)	1-е и 2-е	50,0	28,6	21,4	2,0 ± 0,33	61,7 ± 11,66
	3-е и 4-е	28,6	7,1	64,3	0,9 ± 0,37	153,8 ± 29,07
Черная (26)	1-е и 2-е	23,1	15,4	61,5	0,9 ± 0,25	141,7 ± 19,65
	3-е и 4-е	23,1	15,4	61,5	0,8 ± 0,25	159,4 ± 22,11
Агути (14)	1-е и 2-е	7,1	35,7	57,1	0,7 ± 0,27	144,3 ± 27,28
	3-е и 4-е	7,1	21,4	71,4	0,5 ± 0,25	187,0 ± 35,35
В среднем по самкам и самцам в возрасте 1,5 и 4,1 мес.						
Белая (148)	1-е и 2-е	43,9	16,9	39,2	1,5 ± 0,11	90,7 ± 5,27
	3-е и 4-е	26,4	18,9	54,7	1,1 ± 0,11	120,1 ± 6,98
Черно-пестрая (56)	1-е и 2-е	30,4	8,9	60,7	1,1 ± 0,18	125,5 ± 11,86
	3-е и 4-е	19,6	3,6	76,8	0,6 ± 0,16	199,9 ± 18,89
Черная (78)	1-е и 2-е	19,2	10,3	70,5	0,7 ± 0,14	167,4 ± 13,40
	3-е и 4-е	14,1	9,0	76,9	0,5 ± 0,12	206,6 ± 16,54
Агути (34)	1-е и 2-е	35,3	26,5	38,2	1,4 ± 0,23	82,4 ± 9,99
	3-е и 4-е	23,5	14,7	61,8	0,9 ± 0,22	143,1 ± 17,35
Отселектированное поголовье						
Самки в возрасте 10,4 мес.[2]						
Белая (60)	с 1-го по 4-е	88,3	6,7	5,0	2,7 ± 0,10	28,8 ± 2,63
Черная (36)	»	50,0	33,3	16,7	1,9 ± 0,20	62,8 ± 7,40
Самки в возрасте 22,5 мес.						
Белая (36)	с1-го по 4-е	58,3	22,2	19,4	2,1 ± 0,20	58,5 ± 6,89
Черно-пестрая (16)	»	43,8	25,0	31,2	1,6 ± 0,34	85,3 ± 15,08
Черная (20)	»	60,0	10,0	30,0	2,0 ± 0,31	69,8 ± 11,04
Агути (16)	»	25,0	37,5	37,5	1,1 ± 0,30	109,5 ± 19,36
В среднем по всем самкам						
Белая (96)	с 1-го по 4-е	77,1	12,5	10,4	2,5 ± 0,10	40,6 ± 2,93
Черно-пестрая (24)	»	58,3	16,7	25,0	1,9 ± 0,28	71,0 ± 10,25
Черная (56)	»	53,6	25,0	21,4	1,9 ± 0,17	66,2 ± 6,26
Агути (24)	»	29,2	37,5	33,3	1,2 ± 0,25	102,1 ± 14,74

[1] Выборочные частоты и средние величины рассчитывали по объединенному числу отметок реакции удаления за указанные тестирования.
[2] Из-за малочисленности черно-пестрого и агути фенотипов распределение поведения у них не считали. Остальные объяснения см. в тексте.

но» снизился на 33,3 % ($p < 0,01$). В возрасте 4,1 мес. уже только поросята черно-пестрой окраски реагировали на стресс изоляции снижением у них величины этой реакции на 55,0 % ($p < 0,05$) от теста I к тесту II. При этом стресс изоляции также изменял частные распределения реакции удаления у поросят белой (I = 6,9; *d.f.* = 2; $p < 0,05$) и черно-пестрой (I = 6,1; *d.f.* = 2; $p < 0,05$) окрасок.

Представленные различия по реактивности к стрессу изоляции в полной мере сохраняются при объединении поросят двух возрастов. Выясняется также, что увеличение объема выборки не снижает вариабельность реакции удаления у поросят разной окраски. По сравнению с фоновой вариацией этой реакции «в группе» (CV 82–167 %), стресс изоляции усиливает ее «внутриокрасочную» вариабельность на 32,4 % ($p < 0,001$) у поросят белой, на 59,3 % ($p < 0,001$) у черно-пестрой и на 73,7 % ($p < 0,01$) у поросят агути окрасок.

У мини-свиней дискретное разнообразие окрасок и классы фенотипов по реакции удаления достоверно взаимосвязаны. Коэффициент взаимной сопряженности между окраской и поведением при тестировании «в группе» у самок и самцов в возрасте 1,5 мес. равен 0,244 ($p < 0,001$), в 4,1 мес. – 0,230 ($p < 0,05$) и 0,216 ($p < 0,001$) – у свиноматок обоих возрастов. Стресс изоляции снижает величину этой межгрупповой корреляции у поросят в 1,5 мес. до 0,184 ($p < 0,01$) и уже до недостоверного значения, 0,164 ($p > 0,05$), у поросят в возрасте 4,1 мес.

Для выяснения природы обнаруженной взаимосвязи оценили влияние фактора «генотип хряка» на изменчивость реакции удаления у поросят разных типов окраски при тестировании «в группе», исключающем отмеченное действие на них стресса изоляции (табл. 2, комплекс Ie). Оказалось, что лежащие в основе таких межгрупповых связей различия по средней величине этой реакции не являются генетически обусловленными, а «внутриокрасочная» изменчивость этой реакции в силу ее высокой вариабельности не отличается у поросят разных типов окраски.

Обсуждение

Как и у других видов сельскохозяйственных животных, наследственный полиморфизм реакции удаления является типичным признаком мини-свиней ИЦиГ (Ланкин, Буиссу, 2001; Ланкин и др., 2007). Независимо от влияний среды диапазон изменчивости этой реакции включает два крайних класса контрастных поведенческих фенотипов у всех половозрастных групп этих животных.

Другой заметной особенностью разнообразия реакции удаления у мини-свиней является разнонаправленность внутригрупповых различий в концентрации крайних фенотипов у ремонтного молодняка и свиноматок. В отличие от первых, типичным для свиноматок оказывается более высокая, в среднем на 34–48 %, концентрация спокойного фенотипа, создаваемая косвенным действием селекции по репродуктивным качествам, положительно связанным с отсутствием страха к человеку у свиней (Hemsworth et al., 1989). Поведение мини-свиней спокойного фенотипа отличает ряд селекционно желательных адаптивных признаков (отсутствие страха к человеку, толерантность к хендлингу, резистентность к социальной изоляции), генетически взаимосвязанных со сниженной реактивностью гипофизарно-надпочечниковой системы к стрессовым воздействиям (Ланкин, 1999; Veenema et al., 2003). Все это указывает на целесообразность отбора мини-свиней спокойного фенотипа для решения актуальной задачи селекционного создания генетически «добронравных» и стрессоустойчивых лабораторных линий этих животных (Kohn et al., 2009; Тихонов, 2010; Станкова, Капанадзе, 2012).

Необходимым условием для использования отмеченных признаков поведения в селекции является их достаточное аддитивное генетическое разнообразие (Фолконер, 1985). Однако обнаруженная величина вкладов генотипов хряков (10,8 %) предполагает низкую наследуемость реакции удаления у мини-свиней ИЦиГ, недостаточную для эффективной селекции. К такому же выводу приводят низкие значения наследуемости (8,9–21,6 %) реакции на хендлинг у геттингенских мини-свиней, родственных мини-свиньям ИЦиГ (Капанадзе, Ашуев, 2007; Kohn et al., 2009). По мнению авторов, причиной низкой наследуемости является преобладание вкладов среды, маскирующих проявление генотипических различий в поведении у животных. Очевидно, что решению задачи объективного описания фено- и генотипического разнообразия поведения по отношению к человеку должно предшествовать изучение факторов его средовой вариации у мини-свиней ИЦиГ.

Пол и возраст достоверно не влияли на реакцию удаления у ремонтных самок и самцов в период до возраста 4 мес. (см. табл. 1, 2). Отсутствие влияния пола на эмоциональное поведение в тесте «открытого поля» у мини-свиней этого возраста уже было показано ранее (Kulikov et al., 2014). Более необычным, по сравнению со свиньями заводских линий, оказывается отсутствие возрастных адаптивных изменений в поведении у ремонтного молодняка. Типичным для первых является увеличение к возрасту 5 мес. концентрации спокойного фенотипа, направляемое усилением пищевой мотивации, линейно связанной у них с возрастным увеличением скорости роста (Bigelow, Houpt, 1988; Ланкин и др., 2007). Однако скорость роста и пищевая мотивация у мини-свиней не изменяются от рождения и до возраста 13 мес. (Simianer, Kohn, 2010). Одним из следствий такого постоянства пищевой мотивации, регуляторно отрицательно связанной с проявлением страха к человеку у мини-свиней, оказывается отсутствие влияния возраста на поведение у поросят.

Возрастное угашение реакции страха к человеку у свиноматок также не зависит от влияний пищевой мотивации (см. табл. 2). Обнаруженная у свиноматок старшего поколения низкая скорость увеличения концентрации спокойного фенотипа показывает, что причиной «медленного» формирования у них адаптивного поведения, как и у геттингенских мини-свиней, является привыкание к контактам с человеком (Tsutsumi et al., 2001). Фактором «быстрого» возрастного формирования адаптивного поведения у свиноматок оказывается косвенный отбор особей спокойного фенотипа, вызвавший «скачкообразное» увеличение его концентрации. Таким образом, в согласии с нашим первым предположением (см. введение), пищевая мотивация не участвует в возрастных изменениях реакции удаления у мини-свиней ИЦиГ.

В отличие от нашего второго предположения, селекционное уменьшение пищевой мотивации, снижающейся пропорционально уменьшению живой массы у отбираемых по этому признаку животных (Roberts, 1981; Simianer et al., 2010), не привело к отмене ее регуляторных влияний на оборонительное поведение у мини-свиней ИЦиГ. Относительный вклад пищевой мотивации в общую фенотипическую изменчивость реакции удаления был максимальным (12,8 %) у поросят в возрасте 1,5 мес., снизился в 2,1 раза к возрасту 4,1 мес. и стал недостоверным у свиноматок (см. табл. 2). Естественно предположить, что причиной прогрессирующего снижения силы влияния пищевой мотивации является привыкание мини-свиней к ее регулярным циркадным колебаниям, создаваемым режимом кормления. Действительно, пищевая депривация достоверно влияла на проявление реакции удаления у поросят только через 2 нед после отъема от матерей, с еще незакрепленными у них навыками пищевого поведения. Образование у поросят к возрасту 4,1 мес. устойчивого паттерна пищевого поведения, функционально автономного от внешних/внутренних раздражителей (Хайнд, 1975), привело к отмене у них поведенческой реакции на простое действие пищевой депривации и проявлению такой реакции только на ее комбинированное со стрессом изоляции действие, также затем «затухающей» у свиноматок.

Как и у свиней заводских линий, основным источником средовой вариации реакции удаления у мини-свиней служит взаимодействие «генотип – пищевая мотивация», индуцируемое неустранимыми регуляторными влияниями пищевой мотивации (см. табл. 2) (Ланкин, 2013). Общим неблагоприятным результатом действия этих двух доминирующих по силе влияния факторов оказывается высокая фоновая вариабельность (CV 95–120 %) реакции удаления, существенно усиливаемая стрессом изоляции у мини-свиней (см. табл. 1, 3). Это означает, что действие на реакцию удаления других факторов (пол, возраст, тип окраски и др.), может искажаться (смещаться) векторизованными влияниями доминирующих факторов среды или, в частности, остаться незамеченным. Значительная вариабельность оказывается также характерной для популяционного разнообразия оборонительной реакции в тесте «на перчатку» (CV 135–436 %) у норок и соболей (Трапезов и др., 2008).

Примером, иллюстрирующим необходимость снижения высокой средовой (модификационной) вариабельности реакции удаления, служит анализ природы ее взаимосвязи с типом окраски. Обнаруженное при этом недостоверное влияние генотипов хряков на «внутриокрасочную» изменчивость реакции удаления у потомков предполагает отсутствие генетической связи этой реакции с окраской у мини-свиней, тем не менее показанной для других видов животных (Wilcock, 1969; Трут и др., 2000; Трапезов и др., 2008). Этому предположению также противоречит ранее установленное достоверное влияние генотипов хряков на внутригрупповую изменчивость реакции удаления (см. табл. 2, комплекс I). Вероятным объяснением противоречия служит высокая вариабельность этой реакции «внутри» окрасочных типов свиней, маскирующая действие генотипов отцов (см. табл. 3). Очевидно, для выявления возможных слабых плейотропных эффектов генов окраски на реакцию удаления оказывается необходимым предварительно снизить отмеченные неблагоприятные влияния модификационной изменчивости этой реакции.

Таким образом, результаты работы впервые дают качественное и количественное описание внутри- и межгруппового разнообразия реакции удаления от человека, дополненное детальным анализом действия различных факторов ее изменчивости у мини-свиней ИЦиГ. Наследственный полиморфизм этой реакции формируется у мини-свиней в возрасте 1,5 мес. и не изменяется до полового созревания, что указывает на достаточность его однократного определения в этот период. Селекция на низкую живую массу не отменяет регуляторных влияний пищевой мотивации и взаимодействия «генотип – пищевая мотивация», определяющего в среднем более 50 % общей изменчивости поведения по отношению к человеку у мини-свиней (см. табл. 2, комплекс IIб). Такое превалирование средовых влияний существенно обесценивает использование известных методов определения этого поведения на одном уровне пищевого возбуждения у разных видов животных (Forkman et al., 2007), для проведения объективных этологических и генетических исследований. Сделан вывод, что необходимыми условиями для развития исследований по генетике пассивно-оборонительного поведения по отношению к человеку являются минимизация неблагоприятных влияний модификационной изменчивости и повышение точности метода определения этого селективно-значимого поведения у мини-свиней ИЦиГ.

Благодарности

Работа выполнена на базе ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» на средства федерального бюджета, выделенные на выполнение государственного задания. Бюджетный проект ИЦиГ СО РАН: VI.53.2.1.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ашуев Ж.А., Кулаков А.А., Капанадзе Г.Д. Использование мини-свиней в экспериментальной дентальной имплантации. Биомедицина. 2007;6: 81-88.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991.

Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини-свиней. Биомедицина. 2007;6:70-80.

Козловская М.М. Выявление психотропной активности на модели экспериментально вызванных сдвигов эмоционального состояния. Нейрофармакологическая регуляция системных процессов. Л.: Наука, 1974.

Ланкин В.С. Доместикационное поведение овец. Генетика. 1997; 33(8):1119-1125.

Ланкин В.С. Доместикационное поведение овец. Роль полиморфизма поведения в регуляции стрессовых реакций. Генетика. 1999;35(8):1109-1117.

Ланкин В.С., Буиссу М.Ф. Факторы изменчивости доместикационного поведения у животных продуктивных видов. Генетика. 2001;37(7):947-961.

Ланкин В.С., Буиссу М.Ф., Навю Ж., Бурлот Т., Сигнорет Ж.П. Факторы изменчивости доместикационного поведения свиней специализированных линий. С.-х. биология. 2007;4:34-52.

Ланкин В.С. Генотипическая и модификационная изменчивость пассивно-оборонительного поведения домашних свиней по

отношению к человеку. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(3):452-468.

Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С. Миниатюрные свиньи ИЦиГ – модельный объект для изучения формообразовательного процесса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014; 18(2):279-293.

Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д. Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции. Биомедицина. 2012;1:49-53.

Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи. Новосибирск, 2010.

Трапезов О.В., Трапезова Л.И., Сергеев Е.Г. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на поведенческий полиморфизм в промышленных популяциях американской норки (*Mustela vison Schreber*, 1777) и соболя (*Martes zibellina Linnaeus*, 1758). Генетика. 2008;44(8):516-523.

Трут Л.Н., Плюснина И.З., Прасолова Л.А. Мутации *hooded* и *nonagouti* у серых крыс (*Rattus norvegicus*): эффекты отбора по поведению и фотопериода. Генетика. 2000;30(6):813-822.

Фолконер Д.С. Введение в генетику количественных признаков. М.: Агропромиздат, 1985.

Хайнд Р. Поведение животных. М.: Мир, 1975.

Шатохин К.С., Запорожец В.И., Гончаренко Г.М., Никитин С.В. Характеристика миниатюрных свиней по экстерьерным и поведенческим показателям. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2013;4:32-36.

Bigelow J.A., Houpt T.R. Feeding and drinking patterns in young pigs. Physiol. Behav. 1988;43:99-109.

Christoffersen B., Golozoubova V., Pacini G., Svendsen O., Raun K. The young Gottingen minipig as a model of Childhood and adolescent obesity: influence of diet and gender. Obesity. 2013;21(1): 149-158. DOI: 1038/oby.2012.176

Forkman B., Boissy A., Meunier-Slaun M.-C., Canali E., Jones R.B. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. Physiol. Behav. 2007;92:340-374. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.03.016

Hemsworth P.H., Barnett J.L., Coleman G.J., Hansen C.H. A study of the relationships between the attitudinal and behavioural profiles of stockpersons and the level of fear of humans and reproductive performance of commercial pigs. Appl. Anim. Behav. Sci. 1989;23: 301-314.

Kohn F., Sharifi A.R., Simianer H. Genetic analysis of reactivity to humans in Gottingen minipigs. Appl. Anim. Behav. Sci. 2009;120:68-75. DOI: 10.1016/j.applanim.2009.05.006

Kulikov V.A., Khostskin N.V., Nikitin S.V., Lankin V.S., Kulikov A.V., Trapezov O.V. Application of 3-D imagins sensor for tracking minipigs in the open field test. J. Neurosci. Meth. 2014;235:219-225.

Lind N.M., Arnfred S.M., Hemmingsen R.P., Hansen A.R., Jensen K.H. Open field behaviour and reaction to novelty in Gottingen minipigs: effects of amphetamine and haloperidol. Scand. J. Lab. Anim. Sct. 2005;32(2):103-110.

Rauw W.M., Kanis E., Noordhuizen-Stassen E.N., Grommers F.J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. Livestock Prod. Sci. 1998;56:15-33. DOI: 10.1016/S0301-6226(98)00147-X

Roberts R.S. The growth of mice selected for large and small size in relation to food intake and for efficiency of conversion. Genet. Res. Camb. 1981;38:9-24.

Simianer H., Kohn F. Genetic management of the Gottingen minipig population. J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 2010;62:221-226. DOI: 10.1016/j.vascn.2010.05.004

Sondergaard L.V., Jensen K.H., Hemmingsen R., Hansen A.K., Lind N.M. Characterisation of spontaneous behaviour in Gottingen minipigs in the homepen. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2007;34(2): 91-103.

Sondergaard L.V., Herskin M.S., ladevig J., Holm I.E., Dagnes-Hansen F. Effect of genetic homogenity on behavioural variability in an object recognition test in cloned Gottingen minipigs. Appl. Anim. Behav. Sci. 2012;141:20-24.

Tanida H., Nagana Y. The ability of miniature pigs to discriminate between a stranger and their familiar handler. Appl. Anim. Behav. Sci. 1998;56:149-159.

Tsutsumi H., Morikawa N., Niki R., Tanigawa M. Acclimatization and response of minipigs toward humans. Lab. Anim. 2001;35:236-241. DOI: 10.1258/0023677011911688

Veenema A.H., Meijer O.C., Kloet E.R., Koolhaas J.M. Genetic selection for coping style predicts stressor susceptibility. J. Neuroendocrinol. 2003;15:256-267.

Wilcock J. Gene action and behavior: an evaluation of major gene pleiotropism. Psychol. Bull. 1969;72(1):1-29.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):624-629
DOI 10.18699/VJ15.079

Разнонаправленный половой диморфизм по живой массе у домашних свиней

С.В. Никитин[1], С.П. Князев[2], К.С. Шатохин[3], Г.М. Гончаренко[3], В.И. Ермолаев[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия
[3] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Сибирский научно-исследовательский и проектно-технологический институт животноводства», пос. Краснообск, Новосибирская область, Россия

Для млекопитающих типичным является превышение размеров и массы самцов над размерами и массой самок. В частности, у дикого кабана средняя масса самок составляет около 80 % от массы самцов. В большинстве совокупностей домашних свиней (породах, популяциях, селекционных группах) эта величина варьирует от 70 до 91 % (центральное значение диапазона вариации – 81 %). Однако три генеалогически преемственные селекционные группы домашних свиней (вьетнамская масковая порода Й, минисибс (миниатюрные сибирские свиньи) и светлогорские мини-свиньи) являются исключением. Их специфической особенностью является обратный половой диморфизм по массе – полновозрастные самки тяжелее самцов. Это не типичное для вида *Sus scrofa* явление стало причиной настоящего исследования. Несмотря на то что исследование может рассматриваться только как предварительное, оно позволило сформулировать некоторые предположения. Во-первых, отношение массы полновозрастных самок к массе полновозрастных самцов, очевидно, является видовой характеристикой, отклонения от которой пресекаются стабилизирующим отбором. Во-вторых, у домашних свиней нормальный и обратный половой диморфизм по массе может иметь различную природу: в первом случае это большая продолжительность периода интенсивного роста у самцов, во втором – большая интенсивность роста самок в первый год жизни. В-третьих, характерное для домашних свиней Юго-Восточной Азии раннее половое созревание может быть следствием систематического использования для воспроизводства молодых и поэтому мелких самцов, однако малые размеры самцов, обусловленные их молодостью, не могут быть мишенью искусственного отбора и, соответственно, причиной формирования обратного полового диморфизма по массе. В-четвертых, обратный половой диморфизм может быть следствием склонности самок к раннему ожирению, а это допускает в качестве его генетической причины и единичную мутацию.

Ключевые слова: самцы; самки; живая масса; половой диморфизм.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?
Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С., Гончаренко Г.М., Ермолаев В.И. Разнонаправленный половой диморфизм по живой массе у домашних свиней. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):624-629. DOI 10.18699/VJ15.079

HOW TO CITE THIS ARTICLE?
Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S., Goncharenko G.M., Ermolayev V.I. Multidirectional sexual dimorphism for the live weight in domestic pigs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):624-629. DOI 10.18699/VJ15.079

УДК 636.4.082.12
Поступила в редакцию 18.05.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

Multidirectional sexual dimorphism for the live weight in domestic pigs

S.V. Nikitin[1], S.P. Knyazev[2], K.S. Shatokhin[3], G.M. Goncharenko[3], V.I. Ermolayev[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia
[3] Siberian Research and Technological Design University of Livestock Breeding, Novosibirsk, Russia

In mammals, males are typically larger and heavier than females. In particular, the average weight of wild boar females is about 80% of that of the males. In a vast majority of domestic swine populations (breeds, populations of breeding groups), this value varies from 70 to 91% (the central value of the range of variation of 81%). However, there are three genealogically continuous groups of domestic pigs (Vietnamese Masked breed MY, minisibs and Svetlogorsk mini-pigs) that make exceptions. Their specific feature is the reverse sexual dimorphism in weight – mature females are heavier than males. This phenomenon, not typical of the species *Sus scrofa*, was the reason for the present study. Although this research is preliminary, some assumptions can be made. Firstly, the ratio of the weight of mature females to the weight of mature males is obviously characteristic of the species, deviations from which repressed stabilizing selection. Second, in domestic pigs, normal and reverse sexual dimorphism in weight may be different in nature: in the former case, it is a great length of the period of intensive growth in males, in the latter, a large growth rate of females during the first year of life. The third characteristic of domestic pigs in Southeast Asia, early puberty, may be due to a consistent use of young and therefore small-sized males for reproduction purposes; however, the small size due to their youth, cannot be a target of artificial selection – nor can they be the cause of reverse sexual dimorphism in weight. Finally, reverse sexual dimorphism may be due to a tendency towards early obesity in females, which might be to a single mutation as its genetic cause.

Key words: male; female; live weight; sexual dimorphism.

e-mail: nsv1956@mail.ru

Предполагается, что половой диморфизм по размерам и массе может быть прямым или опосредованным следствием действия генов, контролирующих формирование первичных половых признаков (Haqq, Donahoe, 1998). В частности, это могут быть локусы эстрогенов и андрогенов, которые, оказывая непосредственное влияние на экспрессию гормона роста, участвуют в формировании полового диморфизма, в том числе и по живой массе (Simon, 2009). У млекопитающих самцы, как правило, крупнее и тяжелее самок. Дикий кабан в этом отношении является типичным представителем класса: средняя масса самцов значительно превышает массу самок (Козло, 1974; Moretti, 1995; Vieites et al., 2003). Это превышение унаследовало от своего дикого предка и подавляющее большинство пород и селекционных групп домашних свиней (Кабанов, Терентьева, 1985). Однако всякое правило имеет исключения. Таким исключением оказались три родственные селекционные группы домашних свиней: вьетнамские масковые свиньи породы Й (Тихонов, 2010) и две популяции российских мини-свиней, в формировании которых прямо – минисибс (Тихонов, 2010) или опосредованно – светлогорские мини-свиньи (Капанадзе, 2011) – участвовала вьетнамская масковая порода Й.

Цель настоящей статьи заключается в описании феномена обратного полового диморфизма по живой массе у домашних свиней и обсуждении некоторых из возможных причин его формирования.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили литературные данные о живой массе самцов и самок различных пород и популяций домашних свиней (Кабанов, Терентьева, 1985; Тихонов, 2010; Иванчук, 2011; Капанадзе, 2011; Князев и др., 2015) и европейского дикого кабана (Козло, 1974; Moretti, 1995). Выраженность полового диморфизма по живой массе у исследуемых внутривидовых форм, пород, популяций и селекционных групп оценивали по формуле:

$fm = \frac{\overline{X}_f}{\overline{X}_m} \times 100\ \%$, где $\overline{X}_f$ – средняя живая масса самок (кг); $\overline{X}_m$ – средняя живая масса самцов (кг). Величина *fm*, являющаяся, по сути, количественной, использовалась нами для качественной характеристики совокупностей свиней вида *Sus scrofa*: при $fm < 100\ \%$ – совокупность с нормальным половым диморфизмом по массе, при $fm > 100\ \%$ – совокупность с обратным половым диморфизмом по массе.

Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента (Лакин, 1973).

Результаты

Обзор литературных данных (Козло, 1974; Кабанов, Терентьева, 1985; Moretti, 1995; Тихонов, 2010; Иванчук, 2011; Капанадзе, 2011; Князев и др, 2015) показал, что домашних свиней можно разделить на две группы (табл. 1).

К первой, более многочисленной группе относятся породы и популяции с нормальным для вида *Sus scrofa* проявлением полового диморфизма по живой массе – самцы тяжелее самок (дикий кабан и большинство пород и популяций домашних свиней). Вторую, в которой самки тяжелее самцов, составляют только три генеалогически преемственные селекционные группы (вьетнамская масковая порода Й → минисибс → светлогорские мини-свиньи).

Отношение средней живой массы полновозрастных самок к средней массе самцов в породах и популяциях с нормальным половым диморфизмом по массе варьирует от 71 до 91 % (табл. 1). Рассчитав для рассматриваемой совокупности селекционных форм среднее (центральное) значение данного показателя как среднеарифметическое между крайними значениями диапазона вариации, получаем величину 81 %, которая практически не отличается от таковой, рассчитанной для дикого кабана и равной 80 % (табл. 1). Следует особо отметить, что свойственный исходной дикой форме половой диморфизм по живой массе сохраняется независимо от того, велась селекция на увеличение размеров животных (продуктивные породы) или, напротив, на их уменьшение (мини-свиньи американской и европейской селекции) (табл. 1). Подобный факт наводит на мысль о том, что соотношение массы взрослых самцов и самок у *Sus scrofa* – величина консервативная, поддерживаемая на оптимальном для вида уровне какими-то специальными генетическими механизмами, среди которых может присутствовать и стабилизирующий отбор.

Группу селекционных форм с обратным половым диморфизмом (самки крупнее самцов) представляют вьетнамская масковая порода Й, минисибс и светлогорские мини-свиньи. При этом наибольшее превышение массы самок над массой самцов наблюдается у исходной формы – вьетнамских масковых свиней (169 %). В меньшей степени данное явление выражено у минисибс (130 %), которые были получены скрещиванием масковых свиней с европейской заводской породой ландрас и диким кабаном. В еще меньшей степени обратный половой диморфизм по живой массе выражен у светлогорских мини-свиней (110 %), полученных скрещиванием минисибс с немецкой миниатюрной геттингенской породой (Капанадзе, 2011). Таким образом, снижение вероятной частоты аллелей, унаследованных от вьетнамской масковой породы, в дочерних селекционных группах сопровождается снижением выраженности обратного полового диморфизма. Данное явление вполне закономерно, так как каждая новая селекционная группа получена скрещиванием с формой, имеющей нормальный для вида *Sus scrofa* половой диморфизм по массе (81 %). Естественно, что после таких скрещиваний выраженность обратного полового диморфизма в гибридной дочерней популяции снижается независимо от того, детерминируется данный признак одним локусом или их группой.

Весьма интересным представляются результаты сравнения динамики изменения выраженности полового диморфизма по массе у селекционных форм с его нормальным и обратным проявлением (табл. 2). У животных, относящихся к породам с нормальным диморфизмом (крупная белая и ландрас), до 6 мес. живая масса самцов и самок практически не различается, а в 12 мес. масса самок составляет около 79 % от массы самцов, т. е. практически совпадает с видовой нормой (80–81 %). Динамика роста соответствует представлению о том, что период, в течение которого сред-

Таблица 1. Половой диморфизм по живой массе у диких и домашних свиней

Внутривидовая форма *Sus scrofa*	Отношение массы взрослых самок к массе самцов, %	Литературный источник
Европейский дикий кабан	80	Козло, 1974; Moretti, 1995
Группа селекционных форм с нормальным половым диморфизмом по массе		
Европейские примитивные породы	71–85 (78,0)	Иванчук, 2011
Европейские заводские породы	72–83 (77,5)	Кабанов, Терентьева, 1985; Иванчук, 2011
Южноазиатские породы	70–90 (80)	
Американские и европейские мини-свиньи	80–91 (85,5)	Тихонов, 2010
Группа селекционных форм с обратным половым диморфизмом по массе		
Светлогорские мини-свиньи	110	Капанадзе, 2011
Минисибс	99–161 (130)	Тихонов, 2010
Вьетнамская масковая Й	169	

В скобках приведено среднее (центральное) значение.

Таблица 2. Рост живой массы (кг) самок и самцов у свиней с нормальным и обратным половым диморфизмом

Выборка		Возраст, мес.			
		2	4	6	12
Нормальный половой диморфизм по размерам и массе					
Крупная белая (собственные исследования)	самки	23,40 ± 3,95 (n = 10)	54,98 ± 1,14 (n = 47)	99,25 ± 1,22 (n = 53)	186,90 ± 7,23 (n = 10)
	самцы	23,14 ± 2,09 (n = 7)	58,17 ± 1,41 (n = 52)	99,23 ± 1,06 (n = 56)	236,91 ± 7,68 (n = 23)
$fm = \frac{\overline{X}_f}{\overline{X}_m} \times 100\ \%$		101,12	94,52	100,02	78,89***
Ландрас (Тихонов, 2010)	самки	18,30 ± 0,40 (n = 77)	43,50 ± 0,80 (n = 70)	83,13 ± 1,22 (n = 29)	174,10 ± 2,40 (n = 8)
	самцы	17,90 ± 0,30 (n = 84)	46,20 ± 0,70 (n = 87)	84,58 ± 1,11 (n = 33)	220,40 ± 6,30 (n = 30)
$fm = \frac{\overline{X}_f}{\overline{X}_m} \times 100\ \%$		102,23	94,16*	98,29	78,99***
Обратный половой диморфизм по размерам и массе					
Вьетнамская масковая Й (Тихонов, 2010)	самки	6,52 ± 0,62 (n = 32)	25,00 ± 0,40 (n = 25)	42,84 ± 0,72 (n = 25)	31,12 ± 0,47 (n = 31)
	самцы	6,49 ± 0,17 (n = 37)	18,00 ± 0,52 (n = 31)	25,61 ± 0,73 (n = 31)	52,74 ± 1,07 (n = 25)
$fm = \frac{\overline{X}_f}{\overline{X}_m} \times 100\ \%$		100,46	138,89***	167,28***	169,47***
Минисибс (Тихонов, 2010)	самки	4,67 ± 0,25 (n = 365)	10,94 ± 0,94 (n = 192)	18,90 ± 0,91 (n = 193)	39,59 ± 1,73 (n = 133)
	самцы	4,89 ± 0,17 (n = 390)	10,95 ± 0,95 (n = 175)	17,74 ± 1,07 (n = 148)	33,57 ± 2,29 (n = 66)
$fm = \frac{\overline{X}_f}{\overline{X}_m} \times 100\ \%$		95,50	99,91	106,54	117,93*
Светлогорские мини-свиньи (Капанадзе, 2011)	самки	4,16 ± 0,41 (n = 89)	–	10,2 ± 0,25 (n = 80)	26,5 ± 0,37 (n = 52)
	самцы	4,22 ± 0,29 (n = 78)	–	9,4 ± 0,22 (n = 68)	25,0 ± 0,20 (n = 50)
$fm = \frac{\overline{X}_f}{\overline{X}_m} \times 100\ \%$		98,58	–	108,51*	106,00**

n – объем выборки; *, **, *** статистическая значимость $p < 0{,}05$; $p < 0{,}01$; $p < 0{,}001$ соответственно.

Таблица 3. Динамика изменений отношения средней живой массы самок к средней живой массе самцов в возрасте 12 месяцев в двух популяциях с обратным половым диморфизмом

Минисибс (Тихонов, 2010)		Светлогорские мини-свиньи (Капанадзе, 2011)	
Год измерения признака	Отношение массы самок к массе самцов, %	Год измерения признака	Отношение массы самок к массе самцов, %
1979	120	2004	109
1980	112	2005	109
1981	161	2006	109
1982	126	2007	110
1983	119	2008	105
1984	99	2009	105
1985	109	2010	106
Уравнения линейной регрессии			
$y = -3{,}5568x + 135{,}12$		$y = -0{,}6821x + 110{,}33$	

несуточный прирост увеличивается (период интенсивного роста), у самок европейских заводских пород (Кабанов, 1983), так же как и у исходной формы – дикого кабана (Козло, 1974; Moretti, 1995) – заканчивается раньше, чем у самцов. Затем он сменяется периодом, в течение которого среднесуточный прирост массы постепенно снижается до нулевого значения. В селекционных группах с обратным половым диморфизмом самки начинают превосходить самцов по массе еще во время периода интенсивного роста (табл. 2). При этом у вьетнамской масковой породы Й период, в течение которого интенсивность роста самцов выше интенсивности роста самок, короче, чем в дочерних группах мини-свиней. В целом динамика роста показывает, что соотношение массы самок и самцов в селекционных группах с нормальным и обратным диморфизмом по массе может иметь различную природу. В популяциях с нормальным половым диморфизмом по массе оно определяется различной продолжительностью периода интенсивного роста у самцов и самок. В популяциях с обратным половым диморфизмом его определяет большая интенсивность роста массы самок в первый год жизни.

У домашних свиней, несмотря на все селекционные изменения, фено- и генотипически отдалившие их от дикого кабана, соотношение масс взрослых самок и самцов продолжает соответствовать видовой норме. Исключение представляют только три родственные селекционные группы с обратным половым диморфизмом по массе (табл. 1, 2). Это может означать не только консервативность данного показателя, но и присутствие в популяциях *Sus scrofa* механизмов, возвращающих отношение массы самок и самцов к видовой норме. Одним из доказательств предлагаемой гипотезы может быть присутствие в селекционных группах с обратным половым диморфизмом по массе трендов, направленных на нормализацию отношения массы самок к массе самцов.

По приведенным в литературе данным об изменениях массы самцов и самок на протяжении семилетнего периода, в селекционных группах с обратным половым диморфизмом (Тихонов, 2010; Капанадзе, 2011) были построены динамики изменений отношения массы самок к массе самцов (табл. 3).

Уравнения регрессии показывают, что снижение отношения массы самок к массе самцов наблюдается в обоих случаях, но в популяции минисибс оно более выражено. Вероятно, это обусловлено большим, чем у светлогорских мини-свиней, вкладом вьетнамской масковой породы Й в аллелофонд минисибс. Так как это означает и большую частоту носителей обратного полового диморфизма, происходящий в популяции минисибс процесс ее снижения более заметен. Таким образом, в обеих селекционных группах с обратным половым диморфизмом присутствует тенденция постепенного возврата полового диморфизма по массе к видовой норме *Sus scrofa*. Этот процесс может обеспечивать отсекающий естественный стабилизирующий отбор, вероятно, взаимодействующий с искусственным. Мишенью отбора, скорее всего, являются вызванные ранним ожирением нарушения репродуктивной функции свиноматок. Можно предположить, что обратный половой диморфизм по массе у вьетнамской масковой породы Й представляет или представлял ранее селекционную ценность.

Обсуждение

Обзор литературных данных (Козло, 1974; Кабанов, Терентьева, 1985; Moretti, 1995; Тихонов, 2010; Иванчук, 2011; Капанадзе, 2011; Князев и др., 2015) показал, что у домашних свиней существуют два варианта полового диморфизма по массе тела. У исходной дикой формы и подавляющего большинства пород и популяций домашних свиней масса полновозрастных самцов превышает массу самок (Козло, 1974; Кабанов, Терентьева, 1985; Moretti, 1995; Тихонов, 2010; Иванчук, 2011), и только в трех родственных селекционных группах наблюдается обратное явление – превышение массы самок над массой самцов (Тихонов, 2010; Капанадзе, 2011). Популяции с обратным

половым диморфизмом по живой массе генеалогически преемственны: вьетнамская масковая Й → минисибс → светлогорские мини-свиньи, при этом каждая последующая селекционная группа получена скрещиванием с особями из популяций с половым диморфизмом, нормальным для вида *Sus scrofa* (Тихонов, 2010; Капанадзе, 2011). Соответственно, выраженность обратного полового диморфизма в каждой последующей группе снижается.

Известно, что в контроле роста свиней участвует более 200 локусов (Rothschild et al., 2007), среди которых могут быть и определяющие выраженность и направление полового диморфизма по живой массе. Отбор на крупные размеры и, соответственно, большую интенсивность роста в популяциях домашних свиней всегда был значительно более жестким для самцов, чем для самок. Это обусловлено тем, что для воспроизводства стада самцов требуется в 10 раз меньше (Разведение …, 2013), и они в обязательном порядке должны удовлетворять требованиям класса «элита» (Порядок …, 2009). Для самок же достаточным считается соответствие первому классу бонитировочной шкалы. Однако этот отбор не повлиял на выраженность полового диморфизма по массе у продуктивных пород – она осталась близкой к значению, наблюдаемому у дикого кабана. Отбор на уменьшение размеров также практически не отразился на выраженности полового диморфизма по массе: самки европейских и американских мини-свиней мельче самцов (Bollen et al., 2005; Simianer, Köhn, 2010; Тихонов, 2010). Можно заключить, что в большинстве популяций свиней вида *Sus scrofa*, независимо от того, относятся они к дикой или домашней, крупной или мелкой форме, действуют факторы, которые обеспечивают самцам более крупные размеры и большую массу. Вероятно, к ним относится фактор, который сдвигает массу самцов при рождении в сторону увеличения (Никитин, Князев, 2015). Можно принять, что величина отношения массы полновозрастных самок к массе полновозрастных самцов является видовой константой, независимой от направления векторов отбора по размерам и живой массе животных и, вероятно, поддерживаемой естественным стабилизирующим отбором.

Феномен обратного полового диморфизма по живой массе у вьетнамских масковых свиней породы Й может быть следствием одной или нескольких мутаций. Однако закрепление в популяции этого признака требует достаточно веских причин, способных противодействовать процессу нормализации данного отклонения. У домашних свиней обратный половой диморфизм по размерам и массе предоставляет селекционеру очень слабую мотивацию для искусственного отбора по данному признаку, но она все же существует. Так как самец – наиболее агрессивный и «вооруженный» член стада, который может представлять опасность для человека-хозяина, то для воспроизводства, скорее всего, будут использовать более безопасных и, соответственно, мелких самцов. Малые размеры животного легче обеспечить молодостью самца, чем его генетически обусловленными мелкими размерами. К тому же, первый вариант экономически более выгоден: достаточно каждый репродуктивный цикл использовать и потом забивать на мясо нового молодого самца, а не растить два–три года несколько самцов, чтобы выбрать из них самого мелкого. Таким образом, формирование обратного полового диморфизма по массе у вьетнамской масковой породы в результате использования для воспроизводства мелких самцов представляется сомнительным. Однако система воспроизводства, при которой в каждом репродуктивном цикле используют молодых самцов, может иметь другие последствия. Вполне вероятным становится накопление изменений, приводящих к более раннему, по сравнению с дикой формой, половому созреванию. У дикого европейского кабана самцы созревают в возрасте чуть более одного года (Козло, 1974), у европейских заводских пород – около 8 месяцев (Кабанов, 1983), у вьетнамской масковой породы Й – около 4 мес. (Тихонов, 2010). Более раннее наступление половой зрелости у южноазиатских домашних свиней, по сравнению с европейскими (Кабанов, Терентьева, 1985, Тихонов, 2010), очевидно, обусловлено климатическими условиями региона, в котором выводились эти породы. В Юго-Восточной Азии воспроизводство свиней было возможно круглый год, что не ограничивает минимальный возраст начала репродукции. В Европе при отсутствии специально оборудованных утепленных помещений опорос привязан к весенне-летнему периоду. Поэтому различия между европейскими и азиатскими свиньями по возрасту полового созревания, очевидно, обусловлены естественными региональными климатическими условиями.

Веской причиной для отбора, формирующего в популяции обратный половой диморфизм по массе, может быть его связь с каким-либо важным селекционно ценным признаком. Только при этом условии животные-носители обратного полового диморфизма получают преимущество при искусственном отборе. У самок вьетнамской масковой породы таким признаком могла быть ярко выраженная способность к интенсивному раннему ожирению при весьма умеренном жироотложении у самцов, что демонстрируют фотографии, приведенные в монографии В.Н. Тихонова «Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование» (2010). Для появления такого признака вполне достаточно и единичной доминантной мутации. Во времена, когда ценились жирная свинина и свиной жир, а этот период продолжался до второй половины XX в., такая мутация представляла, несомненно, высокую экономическую и, соответственно, селекционную ценность, а потому могла относительно легко и быстро закрепиться и поддерживаться далее в породе в результате искусственного отбора.

Мутация, вызывающая раннее интенсивное жироотложение у самок, может оказаться непосредственной причиной обратного полового диморфизма по массе. Для его формирования вполне достаточно того, чтобы самки-носители мутации в результате рано начавшегося интенсивного ожирения опережали самцов-носителей мутации по росту живой массы. Как следствие, масса самок превышает массу самцов, а в популяции формируется обратный половой диморфизм по массе. При этом он обусловлен отбором не мелких, медленно растущих самцов, а самок, быстро набирающих значительную массу в результате раннего интенсивного жироотложения. Однако, несмотря на привлекательность моногенной гипотезы обратного полового диморфизма по массе у домашних

свиней, она до экспериментальной проверки имеет те же шансы, что и гипотеза о полигенной детерминации. Поэтому решение вопроса о форме генетического контроля обратного полового диморфизма по массе у домашних свиней может быть принято только после дальнейших исследований.

Выводы

1. В трех родственных популяциях домашних свиней обнаружен феномен обратного полового диморфизма, при котором средняя живая масса взрослых самок оказывается больше средней живой массы взрослых самцов.
2. Выраженность нормального полового диморфизма по массе у свиней вида *Sus scrofa* является величиной консервативной и поддерживается стабилизирующим отбором.
3. Действие фактора или факторов, формирующих нормальный для вида *Sus scrofa* половой диморфизм, не зависит от вектора искусственного отбора по живой массе – оно остается неизменным при отборе как на повышение, так и на понижение размеров и массы животных.
4. Признак «обратный половой диморфизм по массе» может быть следствием склонности самок к раннему интенсивному патологическому ожирению, что и могло послужить основой для его закрепления у вьетнамской масковой породы Й, но при отсутствии искусственного отбора по этому признаку его носители постепенно элиминируются из популяции.

Благодарности

Работа частично поддержана базовым бюджетным финансированием по проектам VI.53.1.2 (ИЦиГ), 0780-2014-0008 (СибНИПТИЖ) и научным проектом РФФИ № 13-04-00968-а.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Иванчук В.А. Биогенетические особенности редких и исчезающих пород свиней. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2011;2:55-60.

Кабанов В.Д. Повышение продуктивности свиней. М.: Колос, 1983.

Кабанов В.Д., Терентьева А.С. Породы свиней. М.: Агропромиздат, 1985.

Капанадзе Г.Д. Биологические и зоотехнические особенности светлогорских мини-свиней, их совершенствование и рациональное использование: Автореф. дис. … д-ра биол. наук. М.: Российский гос. аграрный ун-т – МСХА им. К.А.Тимирязева, 2011.

Князев С.П., Шатохин К.С., Гончаренко Г.М., Фролова В.И., Запорожец В.И., Ермолаев В.И., Никитин С.В. Динамика роста живой массы у мелкой и крупной форм домашней свиньи. Научное обозрение. 2015;6:9-13.

Козло П.Г. Изменчивость веса тела дикого кабана, обитающего в Беловежской Пуще. Березинский заповедник. Исследования. Вып. 3. Минск: Урожай, 1974.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973.

Никитин С.В., Князев С.П. Отбор и адаптация в популяциях домашних свиней. Saarbrucken: Lambert Academy Publishing (LAT), 2015.

Порядок и условия проведения бонитировки племенных свиней. Департамент животноводства и племенного дела России. М., 2009.

Разведение и болезни свиней. Ч. I: (в двух частях). Под общ. ред. А.И. Ятусевича. Витебск: ВГАВМ, 2013.

Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2010.

Bollen P.J.A., Madsen L.W., Meyer O. Ritskes-Hoitinga J. Growth differences of male and female Göttingen minipigs during *ad libitum* feeding: a pilot study. Lab. Anim. 2005;39:80-93.

Haqq C.M., Donahoe P.K. Regulation of sexual dimorphism in mammals. Physiol. Rev. 1998;78(1):33.

Moretti M. Biometric data and growth rates of mountain population of wild boar (*Sus scrofa* L.), Ticino, Switzerland. J. Mountain Ecol. 1995;3:56-59.

Rothschild M.F., Zhi-liang H., Zhihua J. Advances in QTL mapping in pigs. Intern. J. Biol. Sci. 2007;3:192-197.

Simianer H., Köhn F. Genetic management of the Göttingen Minipig population. J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 2010;62:221-226.

Simon F.R. Hormonal regulation of bile secretion. The Liver: Biology and Pathobiology. 5th ed., 2009.

Vieites C.M., Basso C.P. Bartoloni N. Wild boar (*Sus scrofa ferus*): productivity index in an experimental outdoor farm. In. Vet. 2003;5(1):91-95.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):630-637
DOI 10.18699/VJ15.080

Полиморфизм гена *TRPM8* в кыргызской популяции: возможная связь с высокогорной адаптацией

В.Н. Бабенко[1, 2], Ж.Т. Исакова[3], Э.Т. Талайбекова[3], Д.А. Асамбаева[3], В.Ф. Кобзев[1], Т.А. Потапова[1], М.И. Воевода[1, 4], А.А. Алдашев[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия
[3] Институт молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика
[4] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Ген *TRPM8* кодирует рецептор, отвечающий за холодовую чувствительность организма, что предполагает его возможную роль в адаптации человека к холоду. В работе изучена структурная вариабельность гена *TRPM8* по пяти однонуклеотидным полиморфизмам (ОНП) в кыргызской популяции. Полиморфизмы локализованы в кодирующих участках гена, из них три ОНП расположены в интервале 20 п. н. седьмого экзона. Популяционные частоты минорных аллелей ОНП составили: rs13004520 G/C = 0,06; rs28901637 A/T = 0,13; rs11562975 G/C = 0,27; rs7593557 G/A = 0,21; rs11563071 C/G = 0,12. Проанализированная выборка кыргызов (275 человек) включает индивидов, проживающих на разной высоте над уровнем моря с резкими различиями климатических условий. Обнаружено, что у жителей высокогорья (3 200 м н. у. м. и более) частота минорного аллеля rs11562975 была почти в полтора раза ниже ($p < 0,01$) по сравнению с жителями низкогорья/среднегорья (760–3 000 м н. у. м.). Полученные данные подтверждают возможное селективное значение полиморфизма rs11562975 в адаптации к холоду. Сравнение частот гаплотипов между популяциями кыргызов, европейцев, восточных азиатов и африканцев выявило резкое сужение их вариации у европейцев, возможно, связанное с сокращением численности популяции (бутылочное горлышко) в процессе эволюции. В работе рассмотрена экзон-интронная структура гена *TRPM8*. Проанализированы эпигенетические маркеры в районе гена *TRPM8*, найдены 2 сильных сайта связывания инсуляторных белков ctcf, возможно, имеющих отношение к конформации хроматина и регуляции альтернативного сплайсинга. Дана структурно-функциональная характеристика генов семейства TRP белков.

Ключевые слова: ген *TRPM8*; популяционно-генетический анализ; однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП); ассоциации; распределение; адаптация к холоду.

Polymorphism in the *TRP8* gene in Kyrgyz population: putative association with highland adaptation

V.N. Babenko[1, 2], Zh.T. Isakova[3], E.T. Talaibekova[3], D.A. Asambaeva[3], V.F. Kobzev[1], T.A. Potapova[1], M.I. Voevoda[1, 4], A.A. Aldashev[3]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Institute of Molecular Biology and Medicine, National Center for Cardiology and Therapy, Ministry of Health Care of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic
[4] Institute of Internal and Preventive Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

The human *TRPM8* gene encodes a receptor mediating cold sensitivity, and this fact points to its putative role in cold adaptation. The structural variability of the *TRPM8* gene for five single-nucleotide polymorphisms (SNPs) has been studied in Kyrgyz population. The SNPs are located in coding regions of the gene, and three of them are confined to a segment of 20 bp in exon 7. The frequencies of minor SNP alleles are: rs13004520 G/C = 0.06; rs28901637 A/T = 0.13; rs11562975 G/C = 0.27; rs7593557 G/A = 0.21; rs11563071 C/G = 0.12. The analyzed sample of Kyrgyz population includes 275 individuals living at different altitudes and under drastically different climatic conditions. The frequency of the minor rs11562975 allele in highlanders (living above 3 200 m A. S. L. and higher) is one point five lower than in residents of lower regions (760–3 000 m A. S. L.; $p < 0.01$). This result presumes a selective role of rs11562975 in cold adaptation. Comparison of haplotype frequencies in Kyrgyz population with Europeans, East Asians, and Africans shows a clear narrowing of genotype variation in Europeans in comparison to all others. Probably, this phenomenon is related to a population size decline (bottleneck effect) during the evolution. We consider the exon – intron structure of the *TRPM8* gene. Epigenetic markers in the vicinity of the gene have been analyzed. Two strong

УДК 612.017:612.882:612.225:612.062
Поступила в редакцию 08.06.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: bob@bionet.nsc.ru

binding sites for insulator ctcf proteins are present there. They are likely to be associated with chromatin conformation and alternative splicing regulation. A structure – functional characterization of genes for the TRP protein family is provided.

Keywords: *TRPM8* gene, population analysis, single-nucleotide polymorphisms, associations, distribution, cold adaptation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Бабенко В.Н., Исакова Ж.Т., Талайбекова Э.Т., Асамбаева Д.А., Кобзев В.Ф., Потапова Т.А., Воевода М.И., Алдашев А.А. Полиморфизм гена *TRPM8* в кыргызской популяции: возможная связь с высокогорной адаптацией. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):630-637. DOI 10.18699/VJ15.080

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Babenko V.N., Isakova J.T., Talaibekova E.T., Asambaeva D.A., Kobzev V.F., Potapova T.A., Voevoda M.I. Aldashev A.A. Polymorphism in the *TRP8* gene in Kyrgyz population: putative association with highland adaptation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):630-637. DOI 10.18699/VJ15.080

Республика Кыргызстан находится в центре самого крупного в мире континента Евразии. Она расположена среди горных хребтов Тянь-Шаня и Памиро-Алая. Средняя высота территории республики составляет 2 630 м над уровнем моря (м н. у. м.). Около 93 % территории находится на высоте более 1 000 м н. у. м., примерно 42 % – выше 3 000 м н. у. м., 85 % территории Кыргызстана расположено выше 1 500 м н. у. м. На высоте более 2 000 м н. у. м. в Кыргызстане проживает 10 % населения (Агаджанян, Миррахимов, 1970; Миррахимов, 1978; Zheembaev et al., 2005).

На территории республики, в высокогорных районах Тянь-Шаня, погода имеет все признаки субполярного климата: зимы продолжительные и суровые, лето холодное и с заморозками. Среднеянварская температура в высокогорьях колеблется от –40 °C до –50 °C. Летом (июль) в высокогорных районах температура составляет плюс 5–11 °C (Zheembaev et al., 2005). Популяция кыргызов высокогорных регионов Тянь-Шаня и Памира приспособилась к сложным и меняющимся условиям субполярного климата.

В адаптации человека к низкой температуре окружающей среды важную роль играют холодовые рецепторы (Козырева и др., 2011а; Козырева, Воронова, 2014).

Некоторые члены TRP семейства, относящиеся к Ca^{2+}-проницаемым каналам, функционируют в качестве своеобразных детекторов температурных стимулов (McKemy, 2002; Ramsey et al., 2006). Ген *TRPM8* кодирует субъединицу неселективного кальциевого канала меластатинового подсемейства TRP белков. (Ramsey et al., 2006). Канал TRPM8 является гомотетрамером, сформированным из идентичных белковых субъединиц (длиной в 1 104 аминокислоты), содержащих шесть трансмембанных сегментов (S1–S6) и цитоплазматические аминный и карбоксильный домены. Пятый и шестой трансмембранные сегменты и внешние петли между ними образуют пору канала (Ramsey et al., 2006; Latorre et al., 2011). Канал TRPM8 экспрессируется в клетках сенсорных нейронов, активируется низкой температурой и химическими агентами (ментол, ицилин) (McKemy, 2002; Kim et al., 2014). Механизм действия канала TRPM8 опосредован ионами кальция. Активация канала холодом приводит к открытию поры и поступлению катионов в клетку, что вызывает деполяризацию мембраны и создание активного потенциала действия. Белок TRPM8 также экспрессируется в эпителии простаты, легких, селезенки, где его возможная функция – поддержание кальциевого гомеостаза в клетке (Zhang, Barritt, 2006).

Изучение роли гена *TRPM8* в термосенсорике молекулярно-генетическими методами позволило выявить у него несколько мутаций, которые проявляют ассоциации с определенными фенотипическими признаками. Так, индивиды, имеющие гомозиготный генотип GG однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) rs11562975, оказались менее чувствительны к холоду, с адекватным ответом организма на охлаждение (уменьшение теплоотдачи с дыханием и переход на жировой обмен) (Козырева и др., 2011б, 2014). Ген *TRPM8* полифункционален и помимо термочувствительности вовлечен в регуляцию других физиологических процессов (Sabnis et al., 2008; Johnson et a., 2009), что подтверждают ассоциации между показателями липидного обмена и полиморфизмами гена, обнаруженные в популяциях русских и шорцев (Потапова и др., 2011, 2014).

Показано, что чукчи, относящиеся к арктическим монголоидам и проживающие в суровых условиях Крайнего Севера, отличаются от центральноазиатских популяций (тувинцы, казахи, шорцы, хакасы) по частотам аллелей и гаплотипов ОНП (rs28901637 и rs11562975) гена *TRPM8*, что может быть связано с их адаптацией к холоду (Потапова и др., 2008).

Цель работы – изучить частоты аллелей гена *TRPM8* по пяти ОНП (rs13004520 G/C, rs28901637A/T, rs11562975 G/C, rs7593557 G/A, rs11563071 C/G) в популяции кыргызов и оценить их распределение у индивидов, проживающих на разных высотах над уровнем моря. По изученным полиморфизмам дать оценку дивергенции между кыргызским этносом и популяциями европейцев, восточных азиатов и африканцев.

Материалы и методы

У 275 этнических кыргызов было проведено генотипирование 5 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *TRPM8*. Обследованы территориально дистанцированные группы жителей низкогорья (г. Бишкек, 760 м н. у. м.), где климат континентальный сухой, лето жаркое, а зима умеренно холодная (средняя температура января –7 °C). В исследование также были включены жители среднего-

Таблица 1. Характеристика выборок кыргызов (n = 275)

Выборка	Высота над уровнем моря, м	Число индивидов, n
Низкогорье, г. Бишкек	760	37
Среднегорье	1 600–3 000	119
Высокогорье	3 200–3 600	119

Таблица 2. Однонуклеотидные полиморфизмы гена *TRPM8*

ОНП	Экзон	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты
rs13004520	7	G→C	**Arg→Thr**
rs28901637	7	A→T	Pro→Pro
rs11562975	7	G→C	Leu→Leu
rs17868387	7	A→G	**Tyr→Cys**
rs7593557	11	G→A	**Ser→Asn**
rs11563071	23	C→G	Val→Val

рья Иссык-Кульской и Нарынской областей (1 600–3 000 м н. у. м.), где климат резко континентальный, с холодной, почти бесснежной зимой (средняя температура января от –15 до –18 °C) и относительно прохладным летом. Основную группу в исследовании составили жители высокогорья села Ак-Шыйрак Джети-Огузского района Иссык-Кульской области (42°18′35″ с. ш. и 77°53′08″ в. д.); села Арчалы Тонского района Иссык-Кульской области (42°06′36″ с. ш. и 76°59′24″ в. д.); высокогорных долин Ак-Сай и Арпа Нарынской области; села Мургаб Таджикистана (38°10′08″ с. ш. и 73°57′54″ в. д.; 2 800–3 200 м н. у. м.), где климат континентальный, зима холодная и продолжительная (средняя январская температура составляет минус 50–60 °C). В табл. 1 представлены данные исследованных групп.

Популяции

Для сравнения с другими выборками мы воспользовались базой данных «1 000 геномов» (1000genomes.org) и скомпилировали частоты референсных полиморфизмов 3 векторных популяций: европейцев (итальянцы, испанцы, англичане – 365 индивидов), восточных азиатов (китайцы из двух провинций – 100 и 97 индивидов; японцы – 89 индивидов) и африканцев (нигерийцы, кенийцы, гамбийцы – 185 индивидов).

Полиморфизмы

Описание изученных ОНП дано в табл. 2. Все ОНП находятся в кодирующих участках гена *TRPM8*. Четыре ОНП расположены в интервале 20 п. н. седьмого экзона, а два других – в одиннадцатом (rs7593557) и двадцать третьем (rs11563071) экзонах. Данные участки гена кодируют аминный (экзоны 7 и 11) и карбоксильный (экзон 23) домены белка TRPM8.

Выделенным шрифтом в табл. 2 указаны два сцепленных (r^2 = 0,95) компенсаторных ОНП, rs13004520 и rs17868387, находящихся на расстоянии 12 п. н. друг от друга. Оба расположены в экзоне 7. Из-за высокой степени их сцепления для дальнейшего анализа был оставлен только один из них (rs13004520). Мы остановили свой выбор на двух несинонимичных и трех синонимичных заменах. Заметим, что практически все взятые в анализ полиморфизмы – трансверсии, кроме ОНП rs7593557.

Молекулярно-генетические методы исследования

Геномную ДНК из образцов крови выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Maniatis et al., 1982). Анализ выявленных полиморфизмов проводили с помощью аллель-специфической ПЦР. В табл. 3 указаны праймеры и параметры ПЦР, описанные ранее (Потапова и др. 2011, 2014).

Условия аллель-специфических ПЦР были следующими: денатурация при 95 °C 1 мин, отжиг 1 мин (температура отжига для каждого ОНП указана в табл. 3), синтез при 72 °C 1 мин – 30 циклов. Амплификационная смесь в объеме 25 мкл содержала 75 mM трис-HCl (pH 9,0), 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,01 % Tween-20, $MgCl_2$ (концентрация – в табл. 3), 0,2 mM каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 1,25 ед. Taq-полимеразы и 0,5 мкг геномной ДНК.

Продукты аллель-специфических ПЦР оценивали электрофорезом в 3 %-м агарозном геле, окрашивание проводили бромистым этидием и визуализировали гель-документирующей системой GelDoc IT («UVP», Великобритания).

Статистические методы

Межпопуляционные различия оценивали по дистанции Fst (Slatkin, 1994) с помощью программы Arlequin v.3.5.1.2. Уровень значимости дистанций Fst оценивали стохастически, число перестановок – 10 000, уровень значимости p = 0,001. Для проверки отклонения распределения частот генотипов от ожидаемого (Харди–Вайнберга) использовали точный критерий Фишера с оценкой величины

Таблица 3. Структура праймеров и некоторые параметры ПЦР

Идентификационный номер ОНП	Праймер		Длина фрагмента, п. н.	Температура отжига, °C	Концентрация $MgCl_2$, mM
rs13004520	прямой	5′-tgtaccttatggatgacttcacgag-3′ 5′-tgtaccttatggatgacttcacgac-3′	210	60	1,8
	обратный	5′-ggctgctgtggttattgtacacttc-3′			
rs28901637	прямой	5′-ccgatgacttcacaagagataca-3′ 5′-ccgatgacttcacaagagatact-3′	161	57	1,5
	обратный	5′-ccctaaccactgaccttgaata-3′			
rs11562975	прямой	5′-atataggattctgggaggaggcat-3′	207	60	2,5
	обратный	5′-tttgtggttgttgtccaggatattc-3′ 5′-ttgtggttgttgtccaggatattg-3′			
rs7593557	прямой	5′-ctctcacagccttcagcaccag-3′ 5′-ctctcacagccttcagcaccaa-3′	182	69	1,8
	обратный	5′-cagaccacagtccagacccaac-3′			
rs11563071	прямой	5′-actctggcatgggagggtttc-3′ 5′-actctggcatgggagggtttg-3′	218	60	1,8
	обратный	5′-tgcccgggtaatatctttgtgg-3′			

достоверности по методу Монте Карло. Число шагов Марковской цепи – 1 000 000, число обнулений состояния памяти – 100 000 (Arlequin v3.5.1.2; Excoffier et al., 2005). Многомерное шкалирование было произведено с помощью программы XLStat (www.xlstat.com) на основе матрицы попарных различий Fst.

Результаты и обсуждение

Семейство генов TRP

Ген *TRPM8* кодирует неселективные катионовые каналы меластатинового (M) подсемейства TRP белков. Кроме подсемейства M существуют как минимум еще три подсемейства с более чем одним паралогом (TRPC, TRPM, TRPV), а также одиночные семейства TRPA1, TRPT1, TRPS1. Все они, кроме TRPA1, продуцируют альтернативные транскрипты (табл. 4) и имеют медианную длину более 60 кб.

Экзон-интронная структура TRP

Как видно из рис. 1, длина транскрипта статистически слабо связана с числом экзонов, что характерно для тканеспецифических генов, расположенных в гетерохроматиновых районах. Ген *TRPT1*, самый короткий ген семейства TRP, имеет от 7 до 8 экзонов и 6 альтернативных транскриптов (табл. 4). Это единственный ген семейства, не относящийся к тканеспецифическим. Он располагается в эухроматине и экспрессируется в большинстве клеточных линий. Признаком широко экспрессирующегося гена является и его CG-богатый промотор.

Рассматривая структуру и хроматиновый контекст гена *TRPM8*, заметим, что это протяженный ген с медианным числом экзонов, равным 22 (от 4 до 27), вычисленным по 5 аннотированным изоформам. Он имееет в своем составе два сильных сайта связывания инсулятора ctcf, работающих в большинстве клеточных линий. Эти сайты могут иметь отношение как к тканеспецифической конформации хроматина, подавляющей экспрессию *TRPM8*, так и регуляции альтернативного сплайсинга этого гена (например, экспрессия 3′-локализованной короткой изоформы BC033137, 8 экзонов). Кроме сильных сайтов связывания ctcf имеются тканеспецифические, присутствующие в небольшом числе клеточных линий, но также влияющие на альтернативный сплайсинг, в частности экспрессию 5′-локализованной короткой изоформы (AY532375, 4 экзона).

Хотя целью данной работы было исследование распределения частот аллелей ОНП гена *TRPM8* в популяции кыргызов по сравнению с другими популяциями, предполагается, что анализ полиморфизмов в сайтах связывания транскрипционных факторов, в частности CTCF, и учет распределения частот изоформ в различных тканях для выявления специфики функционирования гена будут также актуальны.

Структура гена TRPM8 по 5 полиморфизмам в популяциях

В табл. 5 приведены частоты минорных аллелей в изученных популяциях, особенности распределения которых рассмотрены далее. Невысокие частотные значения обнаружены по минорному C-аллелю rs13004520, который приводит к изменению аминокислоты Arg/Thr в белке. В кыргызской популяции частоты минорных аллелей ОНП rs28901637 и rs11563071 имели близкие значения, сопоставимые с таковыми восточных азиатов, в то время как у европейцев T-аллель (rs28901637) практически отсутствовал (рис. 2). Частоты минорных аллелей rs11562975 и rs7593557 (Ser/Asn) почти в два раза превышали таковые других ОНП кыргызов. Высокие частотные значения аллелей этих ОНП наблюдали у восточных азиатов. Заметим, что частота A-аллеля rs7593557 у восточных азиатов приближались к 0,5 и была высокой у африканцев (табл. 5). Следует также отметить, что частоты минорных аллелей изученных ОНП европейцев не превышают 0,1.

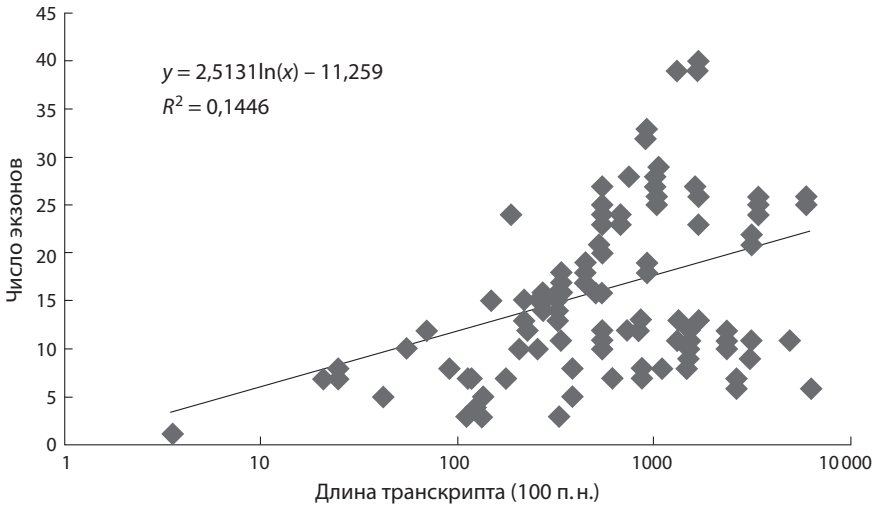


Рис. 1. Зависимость длины транскриптов от числа экзонов генов семейства TRP.

Таблица 4. Характеристика генов TRP

Семейство	Ген	Хромосома	Длина, п. н.	Число изоформ
TRPA	*TRPA1*	chr8	54 334	1
TRPC	*TRPC2*	chr11	132 365	4
TRPC	*TRPC4*	chr13	233 167	7
TRPC	*TRPC1*	chr3	83 464	3
TRPC	*TRPC3*	chr4	72 727	4
TRPC	*TRPC7*	chr5	152 166	6
TRPC	*TRPC5*	chrX	308 463	2
TRPC	*TRPC4AP*	chr20	90 412	7
TRPM	*TRPM5*	chr11	18 530	3
TRPM	*TRPM1*	chr15	160 213	11
TRPM	*TRPM4*	chr19	54 083	7
TRPM	*TRPM8*	chr2	102 124	5
TRPM	*TRPM2*	chr21	92 919	9
TRPM	*TRPM3*	chr9	622 461	24
TRPS	*TRPS1*	chr8	260 505	4
TRPT	*TRPT1*	chr11	2 456	6
TRPV	*TRPV4*	chr12	50 321	6
TRPV	*TRPV3*	chr17	44 804	20
TRPV	*TRPV6*	chr7	25 173	5

Таблица 5. Частоты минорных аллелей изученных ОНП гена *TRPM8* в популяциях

ОНП	Африканцы	Европейцы	Восточные азиаты	Кыргызы
rs13004520	0,003	0,040	0,07	0,06
rs28901637	0,059	0,0068	0,17	0,13
rs11562975	0,024	0,0849	0,20	0,27
rs7593557	0,354	0,0534	0,43	0,21
rs11563071	0,176	0,0849	0,11	0,12

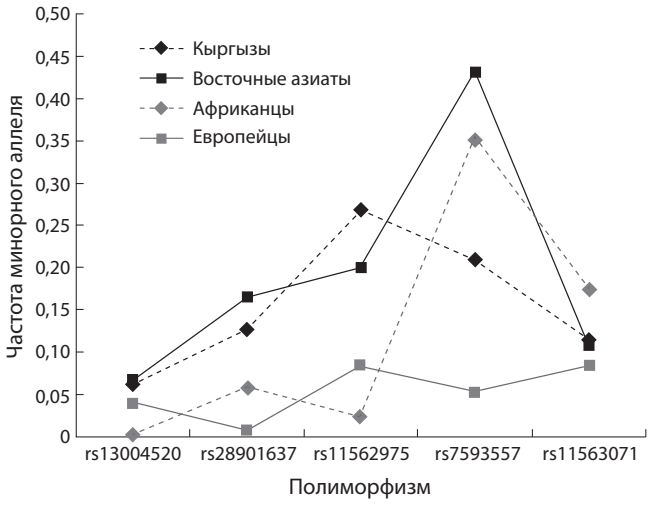


Рис. 2. Частоты минорных аллелей ОНП в популяциях.

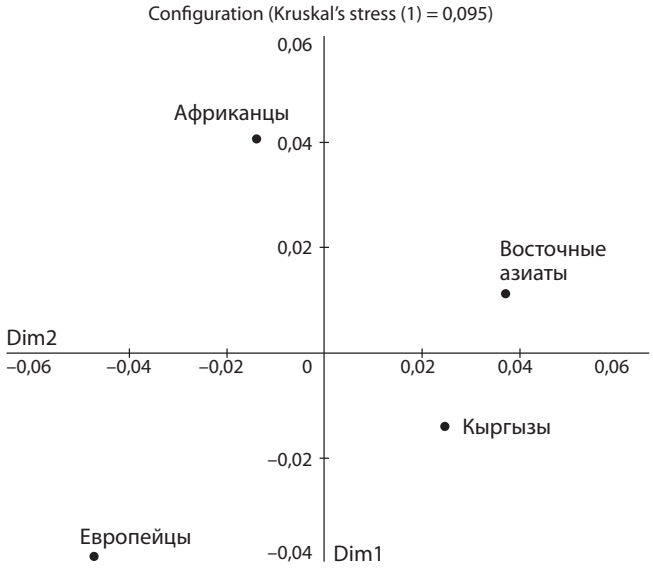


Рис. 3. График многомерного шкалирования, построенный по данным 5 локусов гена *TRPM8*.

Таблица 6. Матрица попарных расстояний (Fst), вычисленная по пяти ОНП гена *TRPM8* для 4 анализируемых популяций

Популяции	Африканцы	Восточные азиаты	Европейцы	Кыргызы
Африканцы	0	0,05	0,08	0,073
Восточные азиаты	0,05	0	0,11	0,02
Европейцы	0,083	0,11	0	0,068
Кыргызы	0,073	0,02	0,068	0

Мы оценили частоты полиморфизмов по четырем популяциям и построили матрицу попарных различий Fst (табл. 6). Выяснилось, что 4 рассмотренные популяции достоверно различаются между собой по распределению частот пяти полиморфизмов (рис. 3) при уровне значимости $p < 10^{-5}$.

Гаплотипическая структура гена *TRPM8*

При анализе попарного сцепления пяти полиморфизмов выяснилось, что три базовые популяции кардинально отличаются друг от друга:

1. Африканская популяция имеет два ОНП (rs11562975 и rs7593557), у которых сцепление между аллеля достоверно.
2. Восточноазиатская популяция имеет плотно сцепленные аллели 4 ОНП, за исключением rs11563071.
3. В европейской популяции не обнаружено сцепление между аллелями rs11562975 и аллелями других ОНП.
4. Кыргызская популяция по профилю сцепленных аллелей ОНП близка к восточным азиатам.

Данные особенности отражены в графике многомерного шкалирования (рис. 3), построенном по матрице Fst (табл. 6). Все попарные различия Fst высоко достоверны ($p < 10^{-5}$).

На рис. 4 представлено распределение частот гаплотипов по изученным ОНП. Европейская популяция имеет один резко выраженный гаплотип, GAGGC, содержащий распространенные аллели ОНП. В других популяциях он также преобладал и составлял половину всех гаплотипов. У кыргызов вторым по представленности был вариант GACGC (0,16) с заменой в третьей позиции относительно основного гаплотипа (GAGGC). У восточных азиатов его частота составила 0,09, более распространен был вариант GAGAC (0,15) с заменой в четвертой позиции. У африканцев данный вариант является наиболее распространенным (0,23) после основного гаплотипа. Частоты остальных вариантов, за исключением одного–двух в популяции, были невысокие. Сравнительный анализ частот мажорных гаплотипов показал резкое отличие европейцев от остальных популяций, возможно, связанное с сокращением численности популяции (бутылочное горлышко) в процессе эволюции.

Генетические различия популяции кыргызов в зависимости от высоты их проживания

Достоверные различия по частотам минорного аллеля rs11562975 выявлены между жителями высокогорья, с одной стороны, и среднегорья и низкогорья, с другой

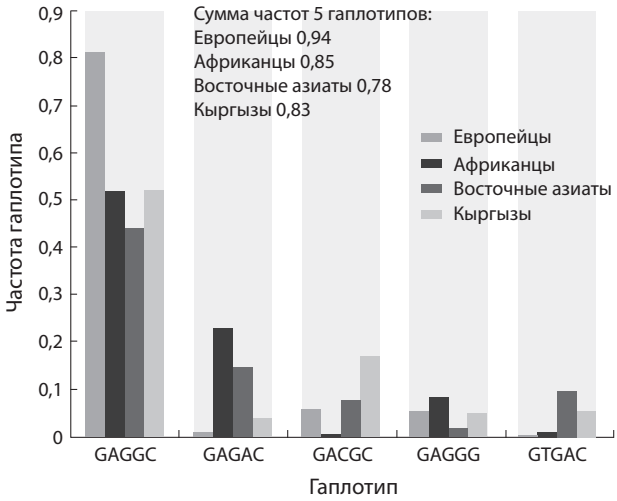


Рис. 4. Частоты мажорных гаплотипов в популяциях.

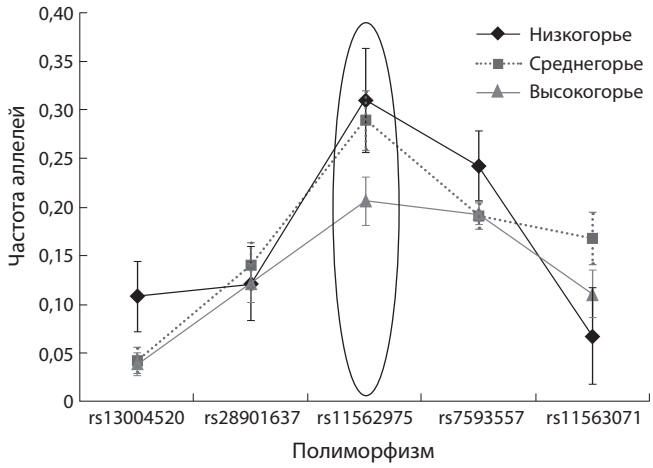


Рис. 5. Частоты минорных аллелей ОНП в разных «высотных» группах.

Даны стандартные отклонения в каждой точке. Полиморфизм с достоверно отличающимися частотами обведен.

Таблица 7. Сравнение частот генотипов и аллелей **rs11562975 гена** *TRPM8* у жителей, проживающих на разных высотах

Генотипы, аллели	Высота над уровнем моря, м		χ^2/p
	760–3 000 (*n* = 156)	3 200 и более (*n* = 119)	
GG	0,51 (80)	0,65 (77)	4,67/0,07
GC	0,38 (59)	0,32 (38)	
CC	0,11 (17)	0,03 (4)	
G	0,70 (219)	0,81 (192)	8,21/0,003*
C	0,30 (93)	0,19 (46)	

*$p < 0,05$. В скобках дано *n* – число индивидов.

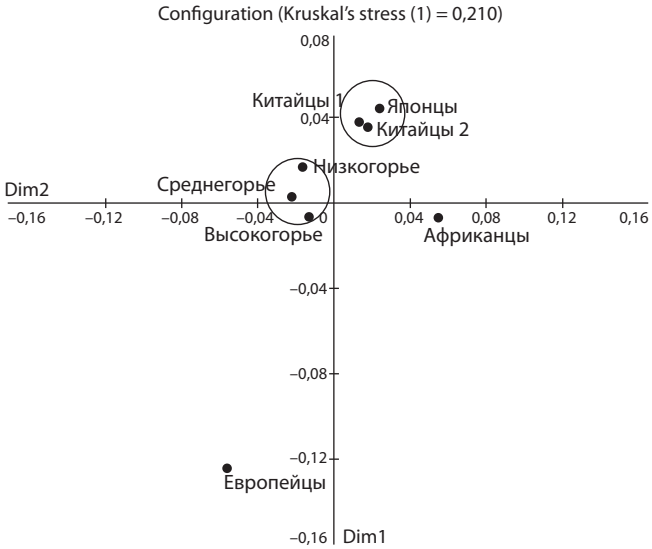


Рис. 6. График многомерного шкалирования, построенный на основе матрицы попарной гетерогенности Fst.

Недостоверно различающиеся популяции обведены овалом. В ином случае популяции различаются с вероятностью $p < 10^{-5}$ (рис. 3).

(рис. 5). Среднегорье в данном случае представлено жителями Иссык-Кульской области (92 человека, 1 600 – 2 700 м н. у. м.). В табл. 7 приведено сравнение частот генотипов и аллелей rs11562975 между жителями высокогорья и среднегорья/низкогорья, сгруппированными на основании табл. 2. Жители высокогорья имели более низкие частоты минорного аллеля этого ОНП ($p < 0,003$). Полученные результаты согласуются с данными Козыревой с коллегами (2011б; 2014). Выяснилось, что кыргызы, проживающие в среднегорье и высокогорье, более удалены от восточноазиатских популяций (китацев и японцев) по сравнении с низкогорьем (рис. 6).

Выводы

1. В работе подтвердилась обнаруженная ранее (Козырева и др., 2011б, 2014) ассоциация ОНП rs11562975 гена *TRPM8* с чувствительностью к холоду. Показано, что у жителей высокогорья (3 200 м н. у. м. и более) частота минорного аллеля rs11562975 была в полтора раза ниже ($p < 0,01$) по сравнению с жителями низкогорья/среднегорья (760–3 000 м н. у. м.).
2. Кардинальные отличия частот гаплотипов европейцев в сравнении с остальными популяциями, вероятно, отра-

жают резкое сокращение их численности (бутылочное горлышко) в процессе эволюции.

3. Кыргызская и восточноазиатская (китайцы и японцы) популяции достоверно различаются между собой по значениям Fst. Такое распределение между этими этносами, а также их сравнение с корневой популяцией африканцев могут говорить о достаточно долгой по времени дивергенции этих популяций или быстрой адаптивной динамике частот аллелей гена. По значениям Fst различия внутри популяции восточных азиатов и кыргызских групп недостоверны.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-54-53091 ГФЕН_а, а также Интеграционным проектом СО РАН. Часть вычислений проведена в Новосибирском суперкомпьютерном центре СО РАН (www.sscc.ru). Работа выполнена в рамках Договора о международном сотрудничестве Российской Федерации и Кыргызской Республики от 14.11. 2013 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Агаджанян Н.А., Миррахимов М.М. Горы и резистентность организма. М.: Наука, 1970.

Козырева Т.В., Воронова И.П. Вовлечение нейрогеномного уровня регуляции в процессы поддержания температурного гомеостаза организма на холоде. Вавилов. журн. генет. и селекции. 2014;18(4):100-1109.

Козырева Т.В., Козарук В.П., Ткаченко Е.Я., Храмова Г.М. Влияние активации ионного канала TRPM8 на терморегуляторные реакции при охлаждении. Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2011а;2:218-226.

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я., Потапова Т.А. Воевода М.И. Реакция респираторной системы на локальное охлаждение у людей с однонуклеотидным полиморфизмом rs11562975 гена термочувствительного ионного канала *TRPM8*. Физиол. человека. 2014; 40(2):94-98.

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я., Потапова Т.А. Ромащенко А.Г., Воевода М.И. Связь однонуклеотидного полиморфизма rs11562975 гена термочувствительного ионного канала TRPM8 с чувствительностью человека к холоду и ментолу. Физиол. человека. 2011б;37(2):71-76.

Миррахимов М.М. Человек и горы. М.: Знание, 1978.

Потапова Т.А., Бабенко В.Н., Кобзев В.Ф. Ромащенко А.Г., Максимов В.Н., Воевода М.И. Анализ ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов гена холодового рецептора TRPM8 с липидными показателями плазмы крови и антропометрическими параметрами у русских. Бюл. эксперим. биол. мед. 2014;157(5): 728-732.

Потапова Т.А., Юдин Н.С., Бабенко В.Н., Пилипенко И.В., Кобзев В.Ф., Григолькау Л.А., Воевода М.И. Полиморфизм гена холодового рецептора TRPM8 в этнических группах Сибири и Дальнего Востока. Информ. вестн. ВОГиС. 2008;12:749-754.

Потапова Т.А., Юдин Н.С., Пилипенко И.В. Ассоциация полиморфизма гена холодового рецептора TRPM8 с липидными показателями крови и антропометрическими параметрами у шорцев. Бюл. эксперим. биол. мед. 2011;151(2):223-226.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics dataanalysis. Evol. Bioinform. Online. 2005;1:47-50.

Johnson C.D., Melanaphy D., Purse A., Stokesberry S.A., Dickson P., Zholos A.V. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2009;296:H1868-H1877.

Kim Y.S., Park J.H., Choi S.J., Bae J.Y., Ahn D.K., McKemy D.D., Bae Y.C. Central connectivity of transient receptor potential melastatin 8-expressing axons in the brain stem and spinal dorsal horn. PLoS One. 2014;9(4):e94080.

Latorre R., Brauchi S., Madrid R., Orio P. A cool channel in cold transduction. Physiology. 2011;26:273-285.

Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

McKemy D.D., Neuhausser W.M., Jullius D. Identification of a cold receptor reveals general role for TRP channels in thermosensation. Nature.2002;416:52-58.

Ramsey S., Delling M., Clapham D.E. An introduction to TRP channels. Annu. Rev. Physiol. 2006;68:619-647.

Sabnis A.S., Reilly C.A., Veranth J.M., Yost G.S. Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2008;295:L194-L200.

Slatkin M. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. Genet. Res. 1994;64(1):71-74. www. xlstat.com

Zhang L., Barritt G.J. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? Endocrine-Related Cancer. 2006;13:27-38.

Zheembaev Zh.Zh., Aldashev A., Merenkova L.P. Problem of mountainous countries. National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic (by the examples of Kyrgyzstan). Threats and challenges of modern times. NAS KR. Bishkek: Ilim. 2005.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):638-646
DOI 10.18699/VJ15.081

Противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами рака мочевого пузыря

М.П. Смаль[1], А.И. Ролевич[2], Т.И. Набебина[2], С.А. Красный[2], Р.И. Гончарова[1]

[1] Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
[2] Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Лесной, Минский район, Беларусь

Продукты генов *HRAS*, *KRAS* и *NRAS* принадлежат к суперсемейству малых гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз), осуществляющих регуляцию клеточного ответа на внешние стимулы посредством активации различных сигнальных путей. В настоящее время доказана роль активирующих мутаций этих генов в патогенезе различных типов раковых заболеваний человека. Вместе с тем значение молекулярных изменений генов семейства *RAS* при раке мочевого пузыря (РМП) остается мало изученным. Целью настоящего исследования явилось изучение частоты и спектра мутаций генов *HRAS*, *KRAS* и *NRAS*, анализ их связи с клинико-морфологическими характеристиками, а также оценка прогностического значения молекулярных изменений этих генов в отношении отдаленных результатов лечения в проспективной когорте из 249 пациентов с РМП. Выявленные с помощью метода SNaPshot мутации генов *RAS* наблюдались с частотой 11,2 %, причем на мутации гена *HRAS* приходилось 64,3 %, *KRAS* – 28,6 % и *NRAS* – 7,1 %. Нами не обнаружено связи между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако при индивидуальном анализе впервые показаны противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами РМП: мутации *HRAS* были статистически значимо ассоциированы с низкой степенью распространения, высокой степенью дифференцировки, папиллярным характером роста и небольшими размерами опухоли ($p < 0,05$), тогда как мутации *KRAS* наблюдались чаще в уротелиальных карциномах, характеризующихся солидным характером роста и наличием метастазов ($p < 0,05$). При анализе прогностического значения молекулярных изменений показана связь мутаций гена *KRAS* со сниженным уровнем онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов, а также в подгруппе с немышечно-инвазивным РМП. Полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярные изменения генов *HRAS* и *KRAS*, по-видимому, характеризуют альтернативные пути патогенеза РМП: мутации *HRAS* связаны с благоприятным, а *KRAS* – с агрессивным течением заболевания.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря; *HRAS*; *KRAS*; *NRAS*; SNaPshot; мутация; прогностическое значение.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Смаль М.П., Ролевич А.И., Набебина Т.И., Красный С.А., Гончарова Р.И. Противоположные ассоциации мутаций генов *HRAS* и *KRAS* с клиническими параметрами рака мочевого пузыря. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):638-646. DOI 10.18699/VJ15.081

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Smal M.P., Rolevich A.I., Nabebina T.I., Krasny S.A., Goncharova R.I. The opposite association of *HRAS* and *KRAS* mutations with clinical variables of bladder cancer. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):638-646. DOI 10.18699/VJ15.081

The opposite association of *HRAS* and *KRAS* mutations with clinical variables of bladder cancer

M.P. Smal[1], A.I. Rolevich[2], T.I. Nabebina[2], S.A. Krasny[2], R.I. Goncharova[1]

[1] Institute of Genetics and Cytology NASB, Minsk, Belarus
[2] N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Lesnoy, Minsk District, Belarus

HRAS, *KRAS* and *NRAS* gene products belong to the superfamily of small GTPases. These proteins regulate cellular response to extracellular stimuli by means of activation of different signaling pathways. Although the role of *RAS* gene mutations in the pathogenesis of various human cancers has been established, the clinical significance of these molecular alterations in bladder cancer remains unclear. The aim of this study was to determine the frequency and spectrum of *HRAS*, *KRAS* and *NRAS* mutations, to analyze their relationships with clinicopathological variables and to determine the prognostic value of these alterations in terms of recurrence, progression and mortality, in a prospective cohort of 249 bladder cancer patients. The frequency of *RAS* mutations detected by the SNaPshot method, was found to be 11.2 %, of which *HRAS* mutations accounted for 64.3 %, *KRAS*, for 28.6 % and *NRAS*, for 7.1 %. We failed to find any correlation between all *RAS* mutations and pathomorphological characteristics. However, when analyzed separately, *HRAS* and *KRAS* mutations were for the first time shown to be associated with the opposite clinical parameters of bladder cancer: *HRAS* mutations were significantly associated with low-stage low-grade papillary tumors of a small size ($p < 0.05$), whereas *KRAS* mutations were associated with non-papillary urothelial carcinomas and the presence of metastasis ($p < 0.05$). Analysis of the prognostic value of molecular alterations revealed an association of *KRAS* mutations with decreased cancer-specific survival in both the whole group of patients and the subgroup with non-muscle invasive disease. The data obtained suggest that *HRAS* and *KRAS* gene mutations may characterize alternative pathways of bladder cancer pathogenesis: *HRAS* mutations indicating benign and *KRAS* mutations, aggressive disease course.

Key words: bladder cancer; *HRAS*; *KRAS*; *NRAS*; SNaPshot; mutation; prognostic value.

УДК 616.62-006.6-089-036.868 (476)
Поступила в редакцию 06.07.2015 г.
Принята к публикации 09.09.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: marharyta.smal@gmail.com

Рак мочевого пузыря (РМП) является третьим по частоте встречаемости онкоурологическим злокачественным новообразованием после рака простаты и почки и в структуре онкологической заболеваемости Республики Беларусь занимает 7-е место среди мужского населения (Океанов и др., 2013). Уротелиальная, или переходноклеточная, карцинома составляет 90 % от всех случаев РМП. На момент постановки диагноза большинство опухолей мочевого пузыря (55 %) являются немышечно-инвазивными (НМИ РМП) и характеризуются как Ta, Tis или T1 (Babjuk et al., 2013). После проведенного лечения у большинства пациентов с НМИ РМП (70–80 %) в течение 5 лет возникают рецидивы, причем у некоторых из них (10–20 %) развивается прогрессия в мышечно-инвазивную форму. У остальных 45 % пациентов уже на стадии выявления заболевания регистрируется мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИ РМП) ≥ T2, характеризующийся неблагоприятным прогнозом ввиду развития отдаленных метастазов в 50 % случаев (Stenzl et al., 2012).

Рядом исследователей была выдвинута гипотеза о том, что морфологическая и клиническая гетерогенность опухолей мочевого пузыря обусловлена различными молекулярно-генетическими путями патогенеза уротелиальной карциномы (Spruck et al., 1994; van Rhijn et al., 2004; Knowles, 2008). Для НМИ РМП характерны мутации приобретения функции («gain-of-function»), затрагивающие онкогены *FGFR3* и *PIK3*, а также делеции длинного плеча хромосомы 9, в то время как для МИ РМП – мутации потери функции («loss-of-function»), наблюдаемые в генах-супрессорах опухолей *TP53*, *RB* и *PTEN*.

Полученные нами ранее данные также подтверждают идею о том, что мутации генов *FGFR3* и *TP53* определяют альтернативные генетические пути патогенеза РМП (Смаль и др., 2013; Smal et al., 2014). Однако только 62 % опухолей мочевого пузыря имеют мутации в этих генах. В связи с этим важным является изучение молекулярных изменений других генов, вовлеченных в канцерогенез. Понимание роли тех или иных молекулярно-генетических изменений позволит установить причину дивергентного клинического поведения обоих типов РМП и определить потенциальные маркеры прогноза клинического течения болезни и таргетной терапии.

Гены семейства *RAS* (*HRAS*, *KRAS* и *NRAS*) являются клеточными протоонкогенами, кодирующими белки с молекулярной массой 21kDa (Yan et al., 1997), которые принадлежат к суперсемейству малых гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз) (Castellano, Santos, 2011). На уровне аминокислотной последовательности белки семейства RAS имеют высокую степень гомологии (приблизительно 80 %) и обладают общей способностью связывать и осуществлять гидролиз гуаниловых нуклеотидов (Castellano, Santos, 2011). Эти белки принимают сигналы с поверхности клеток и передают их внутрь клеток, регулируя клеточный ответ на внешние стимулы посредством активации различных сигнальных путей, включая RAF-MAPK, PI3K и Ral-GEF (Ral-GDS) (Malumbres, Barbacid, 2003). Сигнальные пути, активируемые белками RAS, участвуют в регуляции таких клеточных процессов, как пролиферация, рост, дифференцировка, миграция, апоптоз и выживание (Pollard et al., 2010; Hansel et al., 2012).

Соматические точковые мутации генов *RAS*, приводящие к замене аминокислот в 12-й, 13-й или 61-й позициях, присутствуют в 20–30 % злокачественных опухолей человека (Forbes et al., 2015). Такие молекулярные изменения обусловливают нарушение ГТФазной активности белка RAS, что проявляется в его конститутивно активном состоянии. Последнее в свою очередь ведет к активации нисходящих сигнальных каскадов даже в отсутствие внеклеточных стимулов и, как следствие, к злокачественной трансформации клеток.

Несмотря на то что онкогенная активация генов семейства *RAS* была впервые обнаружена в клеточной линии уротелиальной карциномы человека, роль мутаций этих генов при РМП остается мало изученной, а данные об их частоте и связи с определенным опухолевым фенотипом являются противоречивыми. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение частоты и спектра мутационной изменчивости генов семейства *RAS*, анализ связей между мутациями и клинико-морфологическими параметрами опухоли, а также оценка прогностического значения молекулярных изменений генов *RAS* в отношении отдаленных результатов лечения в проспективной когорте пациентов с РМП.

Материалы и методы

Группа обследования состояла из 249 пациентов с подтвержденным диагнозом РМП, проходивших лечение в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» в период с 2010 по 2014 гг. В исследование включены 195 мужчин и 54 женщины в возрасте от 31 до 88 лет (медиана – 68 лет). Биологическим материалом для анализа служили образцы свежего опухолевого материала и срезов парафиновых блоков от пациентов с РМП. Степень местной распространенности (T) устанавливалась согласно данным патоморфологического анализа удаленного при трансуретральной резекции (ТУР) опухолевого материала. Категории ≥ T2 определялись по данным анализа цистэктомических препаратов или клинического стадирования с использованием методов визуализации, если пациенту не выполнялась цистэктомия. Степень дифференцировки опухолевой ткани (G) определялась гистологически в соответствии с классификациями ВОЗ 1973 и 2004 гг. За местный рецидив принимали появление морфологически верифицированной переходноклеточной карциномы в стадиях Ta, T1 или Tis, локализующейся в мочевом пузыре. Прогрессирование опухолевого процесса устанавливалось в случае развития мышечно-инвазивной опухоли и/или регионарных либо отдаленных метастазов у пациентов, ранее получавших лечение по поводу НМИ РМП. Под скорректированной (онкоспецифической) выживаемостью понимали время от включения пациента в исследование до смерти от РМП. Клинико-анамнестические данные пациентов представлены в табл. 1.

Для выделения ДНК образцы свежего опухолевого материала гомогенизировали, а из парафиновых блоков получали срезы толщиной 10–15 мкм каждый, которые

Таблица 1. Клинико-анамнестические характеристики пациентов

Характеристика	Класс	Количество пациентов	Частота, %
Пол	Мужской	195	78,3
	Женский	54	21,7
Возраст, лет	До 60	67	26,9
	61–70	73	29,3
	71 и более	109	43,8
Опухоль			
Стадия	Ta	38	15,3
	T1	130	52,2
	T ≥ 2	81	32,5
Степень дифференцировки			
Классификация ВОЗ (1973)	G1	88	35,3
	G2	110	44,2
	G3	48	19,3
	Нет данных	3	1,2
Классификация ВОЗ (2004)	PUNLMP* low grade	148	59,4
	high grade	98	39,4
	Нет данных	3	1,2
Мультифокальность	Одиночная	95	38,2
	Множественная	154	61,8
Макроскопический вид	Папиллярная	185	74,3
	Солидная / смешанная	64	25,7
Размер, см	До 3	108	43,4
	3 и более	141	56,6
Наличие метастазов	Есть	20	8,0
	Нет	229	92,0
Статус курения	Не курит	75	30,1
	Курил ранее	70	28,1
	Курит	95	38,2
	Нет данных	9	3,6

* Здесь и в табл. 3: PUNLMP (русск. ПУОНЗП) – папиллярная уротелиальная опухоль с низким злокачественным потенциалом, low grade – низкая степень злокачественности, high grade – высокая.

затем депарафинизировали с использованием ксилола. Геномную ДНК выделяли посредством ферментативной обработки образцов протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией.

Для анализа мутационной изменчивости генов семейства *RAS* первоначально проводили амплификацию шести фрагментов, покрывающих сайты наиболее часто встречающихся мутаций, методом ПЦР с праймерами, предложенными Kompier с коллегами (Kompier et al., 2010). Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержала 1–250 нг геномной ДНК, 1× ПЦР буфер (100 мМ Tris-HCl, pH 8,3, 500 мМ KCl), 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ dNTPs, праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ, 3 % ДМСО и 0,5 единиц активности Dream Taq полимеразы (Thermo Scientific, Литва). После 4-минутной инкубации при 94 °C проводили 35 циклов амплификации (денатурация при 94 °C – 30 с, отжиг при 56 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 50 с) в термоциклере C1000 Thermal cycler (Bio-Rad, США). Конечную элонгацию осуществляли в течение 5 мин при 72 °C. Не вошедшие в реакцию праймеры и dNTPs инактивировали экзонуклеазой I (Thermo Scientific, Литва) и щелочной фосфатазой (Thermo Scientific, Литва). SNaPshot реакцию проводили с использованием подобранных для каждого SNP внутренних праймеров, описанных в работе Kompier с коллегами (2010), и набора ABI Prism SNaPshot multiplex kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ продуктов реакции SNaPshot выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). После окончания разделения образцов полученные данные анализировали с помощью программы GeneMapper v 4.1.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS Sta-

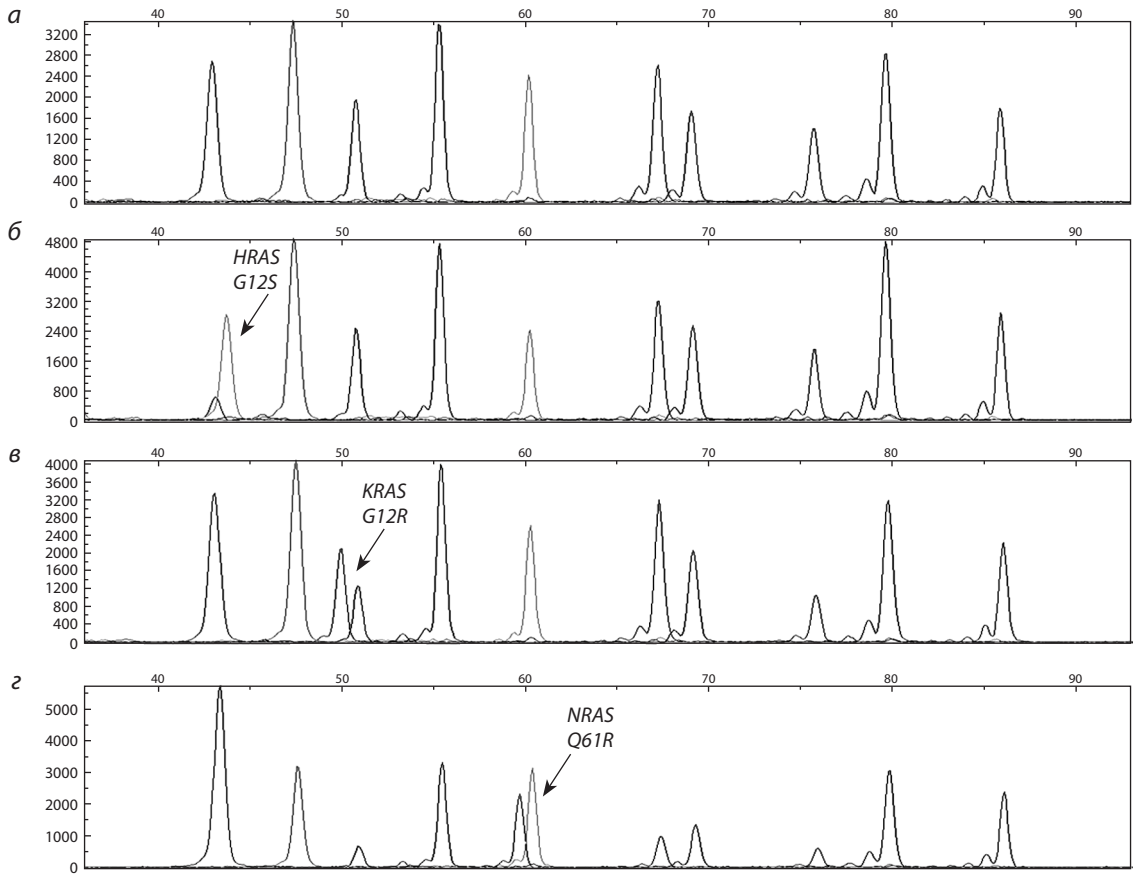


Рис. 1. Результаты SNaPshot анализа мутационного статуса генов семейства *RAS*.

а – анализ образца ДНК дикого типа; *б–г* – анализ образцов ДНК, содержащих мутации *HRAS G12S*, *KRAS G12R* и *NRAS Q61R*.

tistics 17.0. Статистическую значимость различий между исследуемыми группами анализировали с помощью непараметрического теста Манна – Уитни и двустороннего точного критерия Фишера. Безрецидивную выживаемость и выживаемость до прогрессирования для группы из 154 пациентов с НМИ РМП, а также скорректированную (онкоспецифическую) выживаемость для общей группы пациентов ($n = 230$) определяли по методу Каплана – Мейера. Значимость различий между показателями выживаемости в зависимости от мутационного статуса генов *RAS* оценивали при помощи log-rank теста. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Частота и спектр мутаций в генах семейства *RAS*

Для оценки мутационной изменчивости генов семейства *RAS* был использован метод SNaPshot, позволяющий определять 19 наиболее распространенных мутаций одновременно. Примеры мутаций каждого из трех генов представлены на рис. 1.

В целом молекулярные изменения исследуемых генов выявлены в 28 из 249 уротелиальных карцином (11,2 %), причем на мутации гена *HRAS* приходилось 64,3 %, *KRAS* – 28,6 % и *NRAS* – 7,1 %. Частота и спектр всех выявленных мутаций указаны в табл. 2. Ни в одном образце не обнаружено двойных мутаций. Все молекулярно-генетические изменения были представлены 13 трансверсиями (7 – G : C → T : A, 4 – A : T → T : A, 2 – G : C → C : G) и 15 транзициями (8 – G : C → A : T, 7 – A : T → G : C). Наиболее часто встречались мутации *HRAS* Q61R.

Ассоциация мутаций с клиническими параметрами

Мутации всех исследованных генов достоверно чаще встречались у пациентов более молодого возраста ($p < 0,001$, тест Манна – Уитни). При распределении пациентов по возрастным группам мутации генов семейства *RAS* выявлены с частотой 25,4 % (17 из 67) у пациентов до 60 лет, 6,8 % (5 из 73) – у пациентов от 61 до 70 лет и 5,5 % (6 из 109) – у пациентов старше 71 года ($p < 0,001$, точный критерий Фишера). Эта зависимость сохранялась и в случае анализа мутационной изменчивости генов *HRAS* ($p = 0,022$) и *KRAS* по отдельности ($p = 0,013$) (табл. 3). Нами не обнаружено связи между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако при индивидуальном анализе молекулярных изменений онкогенов *HRAS* и *KRAS* отмечались различия в их корреляции с определенными клиническими параметрами.

Так, мутации гена *HRAS* были статистически значимо ассоциированы с такими благоприятными прогностическими характеристиками, как низкая степень распростра-

Таблица 2. Мутации в генах семейства *RAS*, выявленные в уротелиальных карциномах

Ген	Экзон	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Количество мутаций (*n*)
HRAS	1	c.34 G→T	G12C	2
	1	c.34 G→A	G12S	3
	1	c.35 G→A	G12D	1
	1	c.37 G→C	G13R	1
	2	c.181 C→A	Q61K	2
	2	c.182 A→T	Q61L	4
	2	c.182 A→G	Q61R	5
KRAS	1	c.34 G→T	G12C	2
	1	c.34 G→C	G12R	1
	1	c.35 G→A	G12D	4
	1	c.35 G→T	G12V	1
NRAS	2	c.182 A→G	Q61R	2

нения, высокая степень дифференцировки, папиллярный характер роста и небольшие размеры опухоли ($p < 0,05$) (табл. 3). Частота молекулярных изменений гена *HRAS* в немышечно-инвазивных опухолях составила 10,1 %, в мышечно-инвазивных – 1,2 % ($p = 0,009$).

Мутации в гене *KRAS*, напротив, наблюдались чаще в более агрессивных уротелиальных карциномах, характеризующихся солидным характером роста и наличием метастазов ($p < 0,05$) (табл. 3). Кроме того, наблюдалась тенденция к более высокой частоте мутаций гена *KRAS* в мышечно-инвазивных опухолях (4,9 %) по сравнению с немышечно-инвазивными (2,4 %) ($p = 0,28$). Мутации генов *HRAS* и *KRAS* отмечались чаще в одиночных опухолях, однако эта зависимость не достигла уровня статистической значимости. Корреляции между молекулярными изменениями исследуемых генов и такими характеристиками, как пол и статус курения, обнаружено не было.

Прогностическое значение мутаций генов *HRAS* и *KRAS*

Оценка прогностического значения мутаций генов семейства *RAS* проводилась на выборке из 230 пациентов, отдаленные результаты лечения 19 пациентов не прослежены. Длительность наблюдения колебалась от 32 до 60 мес., медиана наблюдения составила 46 мес. В течение этого периода у 46 из 154 (31,8 %) пациентов с НМИ РМП выявлены рецидивы, в 5,8 % (9 из 154) случаев зарегистрировано прогрессирование в мышечно-инвазивную форму, 70 пациентов умерли, в том числе 34 – от РМП.

В отношении рецидивирования и прогрессирования не выявлено прогностическое значение мутационного статуса генов *HRAS* и *KRAS* (табл. 4).

Вместе с тем мутации *KRAS* были статистически значимо ассоциированы со сниженной онкоспецифической выживаемостью в общей группе пациентов (рис. 2), а также в подгруппе с НМИ РМП (табл. 4). Трехлетняя скорректированная выживаемость в группе пациентов, страдающих НМИ и МИ РМП и имеющих молекулярные изменения *KRAS*, составила 47,6 % (ДИ 3,5–91,7 %); в группе без мутаций этого гена – 86,5 % (ДИ 81,8–91,2 %). При анализе пациентов только с немышечно-инвазивными опухолями выявлено, что смертность от РМП при наличии мутации гена *KRAS* составила 33,3 %, тогда как при отсутствии мутации – 5,4 %.

В зависимости от мутационного статуса гена *HRAS* не обнаружено статистически значимых различий в онкоспецифической выживаемости как при совместном, так и при раздельном анализе пациентов с НМИ и МИ РМП.

Обсуждение

Согласно современным данным, около трети всех злокачественных новообразований ассоциированы с мутациями в генах семейства *RAS*. Однако частоты мутаций этих генов значительно варьируют в зависимости от определенного типа рака: активирующие мутации *KRAS* часто обнаруживаются при немелкоклеточном раке легкого (15–20 %), раке толстой кишки (40 %) и аденокарциноме поджелудочной железы (95 %); *NRAS*-мутации выявляются с высокой частотой в гематологических злокачественных новообразованиях (20–30 %) (Castellano, Santos, 2011; Forbes et al., 2015). Опухоли различных локализаций, но имеющие одни и те же мутации генов *RAS*, могут проявлять противоположное биологическое поведение. Так, аденокарцинома легкого и колоректальный рак, несущие мутации *KRAS* в 12-м или 13-м кодонах, являются агрессивными, часто летальными формами рака; карциномы щитовидной железы с такими же мутациями, напротив, характеризуются относительно благоприятным течением (Radkay et al., 2014).

Онкогенная роль мутаций генов семейства *RAS* показана и для РМП. Согласно данным разных авторов, частота молекулярных изменений этих генов при РМП варьирует в пределах от 0 до 45 % (Czerniak et al., 1992; Fitzgerald et al., 1995; Karimianpour et al., 2008; Boulalas et al., 2009; Sjodahl et al., 2011; Ouerhani, Elgaaied, 2011–2012). Подобно результатам, полученным Jebar с коллегами и Kompier с коллегами (Jebar et al., 2005; Kompier et al., 2010), в нашем исследовании частота мутаций генов

Таблица 3. Частоты мутаций генов *HRAS* и *KRAS* в зависимости от клинико-анамнестических характеристик

Характеристика	Мутация *HRAS*		*p*	Мутация *KRAS*		*p*
	да *n* (%)	нет		да *n* (%)	нет	
Пол			0,55			1,0
мужской	13 (6,7)	182		7 (3,6)	188	
женский	5 (9,3)	49		1 (1,9)	53	
Возраст, лет			0,022			0,013
до 60	10 (14,9)	57		6 (9,0)	61	
61–70	4 (5,5)	69		1 (1,4)	72	
71 и более	4 (3,7)	105		1 (0,9)	108	
Опухоль						
Стадия			0,02			0,43
Ta	4 (10,5)	34		0 (0)	38	
T1	13 (10,0)	117		4 (3,1)	126	
T ≥ 2	1 (1,2)	80		4 (4,9)	77	
Степень дифференцировки						
Классификация ВОЗ (1973)			0,074			0,37
G1	11 (12,5)	77		1 (1,1)	87	
G2	6 (5,5)	104		5 (4,5)	105	
G3	1 (2,1)	47		2 (4,2)	46	
Классификация ВОЗ (2004)			0,002			0,48
PUNLMP low grade	17 (11,5)	131		6 (4,1)	142	
high grade	1 (1,0)	97		2 (2,0)	96	
Мультифокальность			0,13			0,49
одиночная	10 (10,5)	85		4 (4,2)	91	
множественная	8 (5,2)	146		4 (2,6)	150	
Макроскопический вид			0,049			0,028
папиллярная	17 (9,2)	168		3 (1,6)	182	
солидная/ смешанная	1 (1,6)	63		5 (7,8)	59	
Размер, см			0,013			0,14
до 3	13 (12,0)	95		1 (0,9)	107	
3 и более	5 (3,5)	136		7 (5,0)	134	
Метастазы			0,38			0,019
есть	0 (0)	20		3 (15,0)	17	
нет	18 (7,9)	211		5 (2,2 %)	224	
Статус курения			0,39			0,40
не курит	8 (10,7)	67		2 (2,7)	73	
курил ранее	4 (5,7)	66		1 (1,4)	69	
курит	5 (5,3)	90		5 (5,3)	90	

RAS составила 11,2 %. Молекулярные изменения гена *HRAS* выявлены в 18, *KRAS* – 8 и *NRAS* – 2 уротелиальных карциномах. При РМП наблюдаемое в настоящей работе превалирование частоты мутаций в гене *HRAS* по сравнению с другими членами семейства *RAS* согласуется с данными, представленными в Каталоге соматических мутаций при раке (COSMIC) (Forbes et al., 2015). В гене *HRAS* наиболее часто встречались мутации Q61L и Q61R, а в гене *KRAS* – G12D. Все выявленные мутации в кодонах 12, 13 и 61 нарушают присущие белкам RAS ГТФазную активность и способность взаимодействовать с клеточными регуляторами GAPs.

Известно, что частота молекулярно-генетических и эпигенетических изменений увеличивается с возрастом. Однако в рамках данной работы установлено, что мутации генов семейства *RAS* статистически значимо чаще наблюдались в группе более молодых пациентов с РМП. Эта зависимость сохранялась и в случае анализа мутаций генов *HRAS* и *KRAS* по отдельности. Похожие результаты были получены и в работе Beukers с коллегами, согласно которым наибольшая частота мутаций *RAS* отмечалась в группе пациентов до 20 лет, равная 40 %; у пациентов старше 60 лет этот показатель составил 11 % (Beukers et al., 2014).

Таблица 4. Анализ прогностического значения мутационного статуса генов *HRAS* и *KRAS* в отношении безрецидивной выживаемости, выживаемости до прогрессирования и онкоспецифической выживаемости

Отдаленные результаты лечения	Подгруппа	Количество событий/ общее число пациентов	3-летняя выживаемость, %	*p*
Рецидивирование	*HRAS wt*	41/138	73,9 ± 3,9	0,93
	HRAS mut	5/16	67,7 ± 11,9	
	KRAS wt	45/151	73,6 ± 3,7	0,82
	KRAS mut	1/3	нет данных	
Прогрессирование	*HRAS wt*	9/138	93,1 ± 2,2	0,29
	HRAS mut	0/16	100	
	KRAS wt	9/151	93,8 ± 2,0	0,68
	KRAS mut	0/3	100	
Скорректированная выживаемость	*HRAS wt*	34/213	84,2 ± 2,6	0,079
	HRAS mut	0/17	100	
	KRAS wt	31/223	86,5 ± 2,4	0,004
	KRAS mut	3/7	47,6 ± 22,5	
Скорректированная выживаемость при НМИ РМП	*HRAS wt*	9/134	94,3 ± 2,1	0,28
	HRAS mut	0/16	100	
	KRAS wt	8/147	95,6 ± 1,8	0,021
	KRAS mut	1/3	50,0 ± 35,4	
Скорректированная выживаемость при МИ РМП	*HRAS wt*	25/79	66,1 ± 5,7	0,52
	HRAS mut	0/1	100	
	KRAS wt	23/76	67,8 ± 5,7	0,074
	KRAS mut	2/4	50,0 ± 25,0	

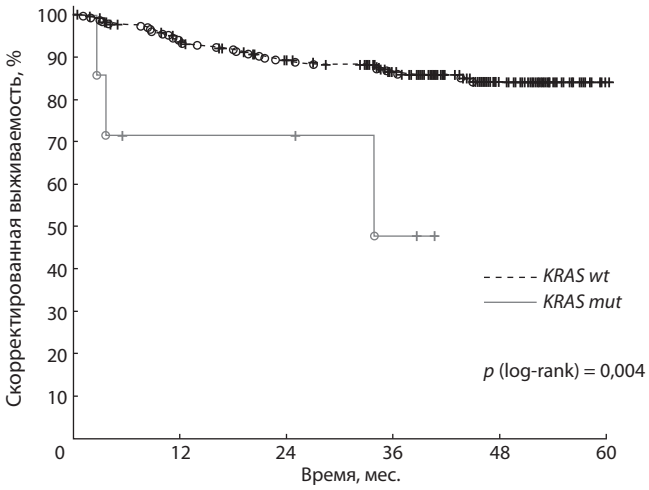


Рис. 2. Скорректированная выживаемость в зависимости от мутационного статуса гена *KRAS* в общей группе пациентов с РМП.

Первоначально предполагалось, что сверхэкспрессия *RAS*, вызванная онкогенной мутацией, изменяет клеточный фенотип таким образом, что клетки приобретают черты, характерные для более агрессивных опухолей (Theodorescu et al., 1990). Однако последующие работы не подтвердили наличие корреляции мутаций генов *RAS* со стадией и степенью дифференцировки опухоли (Jebar et al., 2005; Kompier et al., 2010; Pandith et al., 2010; Ouerhani, Elgaaied, 2011–2012). Нами также не обнаружена связь между всеми мутациями генов семейства *RAS* и патоморфологическими характеристиками. Однако индивидуальный анализ мутаций *HRAS* и *KRAS* показал различия в их распределении в зависимости от клинических параметров уротелиальных карцином.

В настоящей работе мутации гена *HRAS* статистически значимо чаще наблюдались в немышечно-инвазивных высокодифференцированных опухолях небольших размеров. Представленные результаты согласуются с данными, полученными в экспериментах на трансгенных мышах (Zhang et al., 2001). С использованием уротелий-специфичного промотора гена уроплакина II Zhang с коллегами продемонстрировали, что экспрессия мутантного гена *HRAS* в трансгенных мышах индуцирует развитие исключительно гиперплазии и поверхностных папиллярных опухолей мочевого пузыря. Отметим, что в течение всего периода наблюдения, равного 26 месяцам и эквивалентного средней продолжительности жизни здоровой мыши, ни в одном случае авторы не наблюдали прогрессирования в мышечно-инвазивную форму. Несмотря на то что в большинстве исследований не выявлена статистически значимая корреляция мутаций отдельных генов семейства *RAS* с клиническими параметрами, в некоторых из

них прослеживалась тенденция к более высокой частоте мутаций *HRAS* в высокодифференцированных немышечно-инвазивных опухолях (Jebar et al., 2005; Boulalas et al., 2009; Kompier et al., 2010; Wang et al., 2012).

Нами установлено, что мутации гена *KRAS* в отличие от *HRAS* статистически значимо ассоциированы с такими агрессивными характеристиками, как солидный характер роста опухоли и наличие метастазов. Кроме того, наблюдалась тенденция к увеличению частоты молекулярных изменений *KRAS* в мышечно-инвазивных опухолях (4,9 %) по сравнению с немышечно-инвазивными (2,4 %). В научной литературе встречаются единичные работы, в которых сообщается о достоверной связи мутаций *KRAS* с метастазированием в регионарные лимфоузлы при РМП (Nanda et al., 2010). По данным Ouerhani с коллегами, 90 % всех выявленных мутаций гена *KRAS* были обнаружены в низкодифференцированных мышечно-инвазивных опухолях, тогда как только 10 % – в высокодифференцированных (Ouerhani et al., 2013). Формирование метастатического фенотипа ассоциировано с нарушением адгезивных свойств и клеточной подвижности. В ряде работ приводились данные, свидетельствующие о том, что KRAS является более эффективным по сравнению с HRAS стимулятором клеточной подвижности за счет предпочтительной активации Rac белком KRAS и изменения экспрессии различных внутриклеточных протеинов, отвечающих за адгезию (Yan et al., 1997; Castellano, Santos, 2011). Способность KRAS нарушать межклеточную адгезию и стимулировать клеточную подвижность могла бы объяснить высокоинвазивный и метастатический фенотип опухолевых клеток, несущих *KRAS*-мутации.

В настоящем исследовании нами впервые показана связь мутаций *HRAS* и *KRAS* с противоположными патоморфологическими характеристиками при РМП. Большинство авторов анализировали мутации этих генов совместно, возможно, из-за невысокой частоты их встречаемости при РМП либо небольших объемов анализируемых выборок. В пользу того, что мутации генов *HRAS* и *KRAS* могут обусловливать развитие карцином с различным опухолевым фенотипом, свидетельствует их ассоциация со специфическими типами рака и наследственными синдромами. Кроме того, показано, что, несмотря на участие в одних и тех же сигнальных путях, RAS-изоформы проявляют «предпочтительную» специфичность к активации тех или иных эффекторов: KRAS является более сильным активатором RAS-MAPK и Rac-зависимого сигнальных путей, тогда как HRAS более эффективно активирует фосфатидилинозитол-3-киназу (Castellano, Santos, 2011).

Наиболее актуальной проблемой в исследованиях РМП является выявление дополнительных маркеров прогноза клинического течения болезни, поскольку стандартные патоморфологические параметры не всегда обеспечивают его точность. Согласно результатам Kompier с коллегами (Kompier et al., 2010), мутации генов *RAS* не обладают прогностической ценностью. Однако данное заключение было сделано при совместном рассмотрении молекулярных изменений генов *HRAS*, *KRAS* и *NRAS*. В нашем исследовании определение роли мутаций *HRAS* и *KRAS* в предсказании отдаленных результатов лечения проводилось отдельно для каждого гена. В зависимости от мутационной изменчивости гена *HRAS* нами не выявлено статистически значимых различий в отношении рецидивирования, прогрессирования и смертности. Как и в случае с геном *HRAS*, мутации гена *KRAS* не влияли на безрецидивную выживаемость и выживаемость до прогрессирования. Вместе с тем они были статистически значимо ассоциированы со сниженной онкоспецифической выживаемостью в общей группе пациентов и в подгруппе с НМИ РМП.

Таким образом, в настоящем исследовании определена частота мутаций генов семейства *RAS*, равная 11,2 %; обнаружена ассоциация молекулярных изменений исследуемых генов с более молодым возрастом пациентов, а также выявлен противоположный характер распределения мутаций *HRAS* и *KRAS* в зависимости от клинических характеристик. Кроме того, выявлена статистически значимая ассоциация мутаций гена *KRAS* с более низким уровнем онкоспецифической выживаемости в общей группе пациентов, а также в подгруппе с НМИ РМП. Согласно полученным данным можно предположить, что продукты генов семейства *RAS*, по-видимому, выполняют различные функции, а молекулярные изменения этих онкогенов характеризуют альтернативные пути патогенеза РМП: мутации *HRAS* связаны с благоприятным, а *KRAS* – с агрессивным течением заболевания.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (№ договора М15-046).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Океанов А.Е., Моисеев П.И., Левин Л.Ф. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2003–2012). Минск: РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2013.

Смаль М.П., Кужир Т.Д., Ролевич А.И., Поляков С.Л., Набебина Т.И., Красный С.А., Гончарова Р.И. Мутационный статус гена *FGFR3* в проспективной когорте пациентов, страдающих раком мочевого пузыря. Докл. НАН Беларуси. 2013;57(1):96-101.

Babjuk M., Burger M., Zigeuner R., Shariat S.F., van Rhijn B.W., Comperat E., Sylvester R.J., Kaasinen E., Bohle A., Palou Redorta J., Roupret M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. Eur. Urol. 2013;64(4):639-653. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.06.003

Beukers W., Hercegovac A., Zwarthoff E.C. HRAS mutations in bladder cancer at an early age and the possible association with the Costello Syndrome. Eur. J. Hum. Genet. 2014;22(6):837-839. DOI: 10.1038/ejhg.2013.251

Boulalas I., Zaravinos A., Karyotis I., Delakas D., Spandidos D.A. Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma. J. Urol. 2009; 181(5):2312-2319. DOI: 10.1016/j.juro.2009.01.011

Castellano E., Santos E. Functional specificity of Ras isoforms: so similar but so different. Genes Cancer. 2011;2(3):216-231. DOI: 10.1177/1947601911408081

Czerniak B., Cohen G.L., Etkind P., Deitch D., Simmons H., Herz F., Koss L.G. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. Hum. Pathol. 1992;23(11):1199-1204. DOI: 10.1016/0046-8177(92)90285-B

Fitzgerald J.M., Ramchurren N., Rieger K., Levesque P., Silverman M., Libertino J.A., Summerhayes I.C. Identification of H-ras mu-

tations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. J. Natl. Cancer Inst. 1995;87(2):129-133. DOI: 10.1093/jnci/87.2.129

Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P., Leung K., Bindal N., Boutselakis H., Ding M., Bamford S., Cole C., Ward S., Kok C.Y., Jia M., De T., Teague J.W., Stratton M.R., McDermott U., Campbell P.J. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucl. Acids Res. 2015;43:D805-811. DOI: 10.1093/nar/gku1075

Hansel D.E., McKenney J.K., Stephenson A.J., Chang S.S. http://www.springer.com/medicine/pathology/book/978-1-4614-5319-2 The Urinary Tract. A Comprehensive Guide to Patient Diagnosis and Management. N.Y.: Springer, 2012.

Jebar A.H., Hurst C.D., Tomlinson D.C., Johnston C., Taylor C.F., Knowles M.A. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. Oncogene. 2005;24(33):5218-5225. DOI: 10.1038/sj.onc.1208705

Karimianpour N., Mousavi-Shafaei P., Ziaee A.A., Akbari M.T., Pourmand G., Abedi A., Ahmadi A., Afshin Alavi H. Mutations of RAS gene family in specimens of bladder cancer. Urol. J. 2008;5(4):237-242.

Knowles M.A. Molecular pathogenesis of bladder cancer. Int. J. Clin. Oncol. 2008;13(4):287-297. DOI: 10.1007/s10147-008-0812-0

Kompier L.C., Lurkin I., van der Aa M.N., van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Zwarthoff E.C. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLoS One. 2010;5(11):e13821. DOI: 10.1371/journal.pone.0013821

Malumbres M., Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. Nat. Rev. Cancer. 2003;3(6):459-465. DOI: 10.1038/nrc1097

Nanda M.S., Sameer A.S., Syeed N., Shah Z.A., Murtaza I., Siddiqi M.A., Ali A. Genetic aberrations of the K-ras proto-oncogene in bladder cancer in Kashmiri population. Urol. J. 2010;7(3):168-173.

Ouerhani S., Elgaaied A.B. The mutational spectrum of HRAS, KRAS, NRAS and FGFR3 genes in bladder cancer. Cancer Biomark. 2011–2012;10(6):259-266. DOI: 10.3233/CBM-2012-0254

Ouerhani S., Bougatef K., Soltani I., Elgaaied A.B., Abbes S., Menif S. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. Mol. Biol. Rep. 2013;40(6):4109-4114. DOI: 10.1007/s11033-013-2512-8

Pandith A.A., Shah Z., Rasool R., Afroze D., Yousuf A., Parveen N., Wani S., Siddiqi M. Activated H-ras gene mutations in transitional cell carcinoma of urinary bladder in a Kashmiri population. Tumori. 2010;96(6):993-998.

Pollard C., Smith S.C., Theodorescu D. Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). Expert. Rev. Mol. Med. 2010;12:e10. DOI: 10.1017/S1462399410001407

Radkay L.A., Chiosea S.I., Seethala R.R., Hodak S.P., LeBeau S.O., Yip L., McCoy K.L., Carty S.E., Schoedel K.E., Nikiforova M.N., Nikiforov Y.E., Ohori N.P. Thyroid nodules with KRAS mutations are different from nodules with NRAS and HRAS mutations with regard to cytopathologic and histopathologic outcome characteristics. Cancer Cytopathol. 2014;122(12):873-882. DOI: 10.1002/cncy.21474

Sjodahl G., Lauss M., Gudjonsson S., Liedberg F., Hallden C., Chebil G., Mansson W., Hoglund M., Lindgren D. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. PLoS One. 2011;6(4):e18583. DOI: 10.1371/journal.pone.0018583

Smal M.P., Rolevich A.I., Polyakov S.L., Krasny S.A., Goncharova R.I. FGFR3 and TP53 mutations in a prospective cohort of Belarusian bladder cancer patients. Exp. Oncol. 2014;36(4):246-251.

Spruck C.H., Ohneseit P.F., Gonzalez-Zulueta M., Esrig D., Miyao N., Tsai Y.C., Lerner S.P., Schmutte C., Yang A.S., Cote R., Dubeau L., Nichols P.W., Hermann G.G., Steven K., Horn T., Skinner D.G., Jones P.A. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer Res. 1994;54(3):784-788.

Stenzl A., Witjes J.A., Comperat E., Cowan N.C., De Santis M., Kuczyk M., Lebret T., Ribal M.J., Sherif A. Guidelines on bladder cancer: muscle-invasive and metastatic. Arnhem: European Association of Urology (EAU), 2012.

Theodorescu D., Cornil I., Fernandez B.J., Kerbel R.S. Overexpression of normal and mutated forms of HRAS induces orthotopic bladder invasion in a human transitional cell carcinoma. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990;87(22):9047-9051.

van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Vis A.N., Kirkels W.J., Boeve E.R., Jobsis A.C., Zwarthoff E.C. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. Cancer Res. 2004;64(6):1911-1914. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2421

Wang A.X., Chang J.W., Li C.Y., Liu K., Lin Y.L. H-ras mutation detection in bladder cancer by COLD-PCR analysis and direct sequencing. Urol. Int. 2012;88(3):350-357. DOI: 10.1159/000336132

Yan Z., Chen M., Perucho M., Friedman E. Oncogenic Ki-ras but not oncogenic Ha-ras blocks integrin beta1-chain maturation in colon epithelial cells. J. Biol. Chem. 1997;272(49):30928-30936. DOI: 10.1074/jbc.272.49.30928

Zhang Z.T., Pak J., Huang H.Y., Shapiro E., Sun T.T., Pellicer A., Wu X.R. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. Oncogene. 2001;20(16):1973-1980.