

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”.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, базу данных Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

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».

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, профессор (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. Амтиславская – 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, проф. (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, проф. (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: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич. Компьютерная графика и верстка: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина. Подписано в печать 26.08.2016 г. Формат бумаги 60 × 84¹/₈. Усл. печ. л. 19,3. Тираж 200 экз. Заказ № 220.

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

Эволюция и видообразование

- 403 **ОБЗОР**
Некоторые результаты молекулярно-филогенетических исследований байкальских эндемичных беспозвоночных
Д.Ю. Щербаков, М.В. Коваленкова, О.О. Майкова

- 408 **ОБЗОР**
Хромосомы и видообразование у туко-туко (*Stenomys*, *Huystriognathi*, *Rodentia*)
А.А. Торгашева, Е.А. Башева, М.Х. Гомес Фернандес, П. Мироль, П.М. Бородин

- 416 **ОБЗОР**
Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления
Л.А. Першина, Н.В. Трубачева

Генетика развития

- 426 **ОБЗОР**
Генетика старения и долголетия
А.А. Москалев, Е.Н. Прошкина, А.А. Белый, И.А. Соловьев

- 441 **ОБЗОР**
Стволовые клетки растений: единство и многообразие
И.Е. Додуева, В.Е. Творогова, М. Азарахи, М.А. Лебедева, Л.А. Лутова

- 459 **СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР**
Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише стволовых клеток корня
Е.А. Ощепкова, Н.А. Омелянчук, М.С. Савина, Т. Пастернак, Н.А. Колчанов, Е.В. Землянская

Актуальные технологии генетики и селекции

- 475 **ОБЗОР**
Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений
А.В. Кочетов, В.К. Шумный

- 482 **ОБЗОР**
Теоретические аспекты гетерозиса
Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, М.Н. Шантуренко

- 493 **ОБЗОР**
Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии
А.В. Смирнов, А.М. Юнусова, В.А. Лукьянчикова, Н.Р. Баттулин

- 511 **ОБЗОР**
Перспективные возможности использования молекулярно-генетических подходов для управления технологическими свойствами зерна пшеницы в контексте цепочки «зерно – мука – хлеб»
Е.К. Хлесткина, Т.А. Пшеничникова, Н.И. Усенко, Ю.С. Отмахова

- 528 **ОБЗОР**
Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда
Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина

- 537 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическое разнообразие растений-регенерантов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), созданных методом культуры пыльников
Д. Грауда, К. Жагата, Г. Ланка, В. Страздиня, В. Фетере, Н. Лисина, Н. Красневска, О. Фокина, А. Микельсоне, Р. Орницанс, И. Белогрудова, И. Рашаль

Генетика и селекция растений

- 545 **ОБЗОР**
Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне
О.П. Митрофанова, А.Г. Хакимова

- 555 **ОБЗОР**
Применение достижений генетики в селекции плодовых культур: вклад Мичуринского отделения Вавиловского общества генетиков и селекционеров
Н.И. Савельев, Н.Н. Савельева

Evolution and speciation

- 403 **REVIEW**
Recent results of molecular-phylogenetic studies of endemic invertebrates inhabiting Lake Baikal
D.Yu. Sherbakov, M.V. Kovalenkova, O.O. Maikova
- 408 **REVIEW**
Chromosomes and speciation in tuco-tuco (*Ctenomys*, Hystricognathi, Rodentia)
A.A. Torgasheva, E.A. Basheva, M.J. Gomez Fernandez, P. Mirol, P.M. Borodin
- 416 **REVIEW**
Interspecific incompatibility in wide hybridization of plants and ways to overcome
L.A. Pershina, N.V. Trubacheeva

Developmental genetics

- 426 **REVIEW**
Genetics of aging and longevity
A.A. Moskalev, E.N. Proshkina, A.A. Belyi, I.A. Solovyev
- 441 **REVIEW**
Plant stem cells: unity and diversity
I.E. Dodueva, V.E. Tvorogova, M. Azaraksh, M.A. Lebedeva, L.A. Lutova
- 459 **SYSTEMATIC REVIEW**
Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche
E.A. Oshchepkova, N.A. Omelyanchuk, M.S. Savina, T. Pasternak, N.A. Kolchanov, E.V. Zemlyanskaya

Current technologies in genetics and breeding

- 475 **REVIEW**
Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes
A.V. Kochetov, V.K. Shumny

- 482 **REVIEW**
Theoretical aspects of heterosis
L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky, M.N. Shapturenko

- 493 **REVIEW**
CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering
A.V. Smirnov, A.M. Yunusova, V.A. Lukyanchikova, N.R. Battulin

- 511 **REVIEW**
Prospective applications of molecular genetic approaches to control technological properties of wheat grain in the context of the “grain – flour – bread” chain
E.K. Khlestkina, T.A. Pshenichnikova, N.I. Usenko, Yu.S. Otmakhova

- 528 **REVIEW**
Application of DNA markers in molecular breeding and genetic studies of grapevine
E.T. Il'nitskaya, M.V. Makarkina

- 537 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture
D. Grauda, K. Žagata, G. Lanka, V. Strazdina, V. Fetere, N. Lisina, N. Krasnevskaya, O. Fokina, A. Mikelsone, R. Ornicans, I. Belogradova, I. Rashal

Plant genetics and breeding

- 545 **REVIEW**
New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content
O.P. Mitrofanova, A.G. Khakimova

- 555 **REVIEW**
Using achievements of fruit crop genetics and breeding: a contribution from the Michurinsk Department of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders
N.I. Savel'ev, N.N. Savel'eva



Дорогие читатели Вавиловского журнала генетики и селекции!

Перед вами номер, посвященный 50-летию юбилею ВОГиС. Аббревиатура ВОГиС имеет два значения – Всесоюзное общество генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (до 1992 г.) и Вавиловское общество генетиков и селекционеров (после 1992 г.).

Первый учредительный съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова прошел в Москве в мае 1966 г. на базе Главного ботанического сада АН СССР. Президентом общества был избран академик Б.Л. Астауров, ученик и сотрудник Н.К. Кольцова – одного из основателей отечественной генетической школы.

Создание генетического общества в СССР стало возможным благодаря восстановлению генетики в правах после длительных гонений. В советский период общество насчитывало более 10000 членов, было проведено шесть съездов (1966 и 1972 гг. – Москва, 1977 – Ленинград, 1982 – Кишинёв, 1987 – Москва, 1992 – Минск). На последнем, 6-м съезде в связи с ликвидацией СССР было принято решение о прекращении существования Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. В этом же году учреждено Вавиловское общество генетиков и селекционеров, которое стало правопреемником Всесоюзного общества, поэтому сегодня мы по праву отмечаем 50-летний юбилей ВОГиС. Официальные торжественные мероприятия пройдут 8–10 ноября 2016 г. в Москве в рамках юбилейной конференции (<http://50.vogis.org/>).

Со дня учреждения Вавиловского общества генетиков и селекционеров, так же как и в советский период, успели состояться шесть съездов (1994 г. – Саратов, 1999 – Санкт-Петербург, 2004 – Москва, 2005 – Омск, 2009 – Москва, 2014 – Ростов-на-Дону). Сейчас общество насчитывает около 2500 членов, в его состав входят 29 отделений, действующих в 32 субъектах Российской Федерации.

Президентами ВОГиС в разные годы были академики Б.Л. Астауров, Н.В. Турбин, Н.П. Бочков, В.А. Струнников, С.Г. Инге-Вечтомов, В.К. Шумный. В настоящее время общество возглавляет академик И.А. Тихонович.

Важнейшая миссия ВОГиС – интеграционная. До реформы РАН и создания ФАНО именно ВОГиС было организацией, объединявшей генетиков и селекционеров, работавших в институтах, которые десятилетиями относились к разным ведомствам (АН СССР и ВАСХНИЛ – в советский период, РАН и РАСХН – в постсоветское время).

Другая важная задача ВОГиС – содействие повышению уровня генетического образования в высшей школе, улучшение квалификации преподавателей. Генетика – одна из наиболее динамично развивающихся областей современной науки. Постоянные курсы повышения квалификации, на которых преподаватели получают новейшие знания от исследователей из первых рук, крайне необходимы. Первый семинар по генетике для преподавателей университетов состоялся еще в преддверии создания ВОГиС, 16 февраля – 13 марта 1965 г., в Москве. Среди лекторов были Н.В. Тимофеев-Ресовский, М.Е. Лобашев, А.А. Прокофьева-Бельговская, Б.Л. Астауров, А.Н. Белозерский, В.А. Энгельгардт. С тех пор такие мероприятия проводились регулярно. Последние из них были организованы в 2013 и 2014 гг., и на каждом выступало более 30 лекторов – ведущих ученых в области генетики, эволюции, селекции, молекулярной биологии и медицинской

**Устав
Всесоюзного общества генетиков
и селекционеров
им. Н. И. Вавилова
при Академии наук СССР**

ПРЕЗИДИУМ АКАДЕМИИ НАУК СОЮЗА ССР

ПОСТАНОВЛЕНИЕ

от 23 сентября 1966 года № 658

г. Москва

Об уставе **Всесоюзного общества генетиков и селекционеров** (представление Секции химико-технологических и биологических наук)

Президиум Академии СССР ПОСТАНОВЛЯЕТ:

1. Утвердить Устав Всесоюзного общества генетиков и селекционеров, одобренный Учредительным съездом Общества 31 мая 1966 г. (приложение).
2. Войти с ходатайством в Совет Министров СССР о присвоении Всесоюзному обществу генетиков и селекционеров имени академика Н. И. Вавилова.

Президент
Академии наук СССР
академик *М. В. КЕЛДЫШ*

Главный ученый секретарь
Президиума Академии наук СССР
академик *Я. В. ПЕЙВЕ*

Приложение
к Постановлению Президиума АН СССР
от 23 сентября 1966 г. № 658;
к Постановлению Президиума АН СССР
от 25 января 1973 г. № 102

**УСТАВ
ВСЕСОЮЗНОГО ОБЩЕСТВА
ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ
им. Н. И. ВАВИЛОВА**

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОБЩЕСТВА

§ 1

Всесоюзное общество генетиков и селекционеров является добровольной научно-общественной организацией граждан СССР, ведущих работу в области генетики и селекции.

§ 2

Всесоюзное общество генетиков и селекционеров состоит при Отделении общей биологии Академии наук СССР.

§ 3

Основные цели и задачи Всесоюзного общества генетиков и селекционеров:

а) активное участие в развитии в СССР всех отраслей генетики и селекции на основе дальнейшего вскрытия объективных закономерностей наследственности и изменчивости живых организмов и привлечение работников науки и практики к решению народнохозяйственных задач;

б) содействие членам Общества в повышении их квалификации, в организации исследований, реализации результатов их научных работ, а также в установлении

4

генетики. Проведение очередных курсов запланировано в Новосибирске в 2017 г.

Кроме того, ежегодно в разных городах России под эгидой ВОГиС проходит более десятка крупных отечественных и международных научных мероприятий, основная цель которых – обсуждение новейших достижений и развитие сотрудничества в области генетики и селекции.

Журнал, который вы держите в руках, первоначально возник как печатный орган ВОГиС (в 1997 г.) и до 2011 г. носил название «Вестник ВОГиС».

В текущем номере, посвященном 50-летию юбилею ВОГиС, вниманию читателей предложены обзорные статьи, затрагивающие ключевые направления генетики:

эволюционную генетику, генетику развития, генетику человека, генетику животных и генетику растений. Большое внимание уделено актуальным технологиям генетики и селекции: гетерозису, методам получения удвоенных гаплоидов, маркер-ориентированной селекции, подходам генетической инженерии и прорывной современной технологии – геномному редактированию. В заключение представлены обзорные статьи по результатам председательских исследований и достижениям практической селекции.

Поздравляем генетиков и селекционеров России с юбилеем Вавиловского общества и желаем творческих успехов!

*Академик РАН В.К. Шумный,
Президент ВОГиС с 2004 по 2014 г.,
ныне – Почетный Президент ВОГиС*

Некоторые результаты молекулярно-филогенетических исследований байкальских эндемичных беспозвоночных

Д.Ю. Щербаков^{1, 2} , М.В. Коваленкова¹, О.О. Майкова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук», Иркутск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Байкал и населяющая его фауна стали объектом систематических эволюционных исследований более века назад. По мере развития методического арсенала биологии практически все подходы были использованы и для выяснения происхождения населения Байкала. Настоящий обзор посвящен в основном итогам применения методов молекулярной филогенетики. Исключительное таксономическое богатство озера, колоссальное разнообразие биотопов и большой объем знаний о самых разных аспектах функционирования байкальской экосистемы позволяют исследовать такие детали механизмов видообразования, которые в других обстоятельствах гораздо менее доступны. Главные общие черты современных эволюционных процессов в богатых видами группах беспозвоночных состоят в том, что, во-первых, большинство из них молодо относительно Байкала, во-вторых, в том, что видообразование происходит симпатрически, поскольку, несмотря на свои размеры, геологическая история Байкала лишена эпизодов его подразделенности, достаточно долговременной для аллопатрического видообразования. Репродуктивные барьеры, скорее всего, образовались в соответствии с довольно сложными сценариями, которые формировались под действием глобальных климатических процессов. Это приводило к ядерным и митохондриальным интрогрессиям. Возможно, в результате этого в Байкале широко распространены переходные формы организмов, а таксономический статус многих из них определить очень сложно. Интересной особенностью также оказалось практически полное отсутствие экспериментальных свидетельств коэволюции видов, экологически тесно связанных друг с другом. В обзоре рассмотрены результаты эволюционных исследований, в основном посвященным букетам видов – монофилитичным группам организмов, которые обеспечивают исключительно высокое видовое разнообразие Байкала и механизмы формирования которых во многом остаются загадочными.

Ключевые слова: Байкал; биоразнообразие; механизмы эволюции.


КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Щербаков Д.Ю., Коваленкова М.В., Майкова О.О. Некоторые результаты молекулярно-филогенетических исследований байкальских эндемичных беспозвоночных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):403-407. DOI 10.18699/VJ16.169

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sherbakov D.Yu., Kovalenkova M.V., Maikova O.O. Recent results of molecular-phylogenetic studies of endemic invertebrates inhabiting Lake Baikal. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):403-407. DOI 10.18699/VJ16.169

УДК 562(282.256.341):575.89
Поступила в редакцию 28.04.2016 г.
Принята к публикации 29.06.2016 г.
© АВТОРЫ, 2016

 e-mail: sherb@lin.irk.ru

Recent results of molecular-phylogenetic studies of endemic invertebrates inhabiting Lake Baikal

D.Yu. Sherbakov^{1, 2} , M.V. Kovalenkova¹, O.O. Maikova¹

¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Lake Baikal and its invertebrates became a subject of systematic evolutionary studies more than a century ago. Exceptional taxonomic diversity of the lake's fauna, high variability of habitats and large volume of auxiliary knowledge on the ecosystem enables one to study fine details of speciation mechanisms hardly accessible in other model systems. Parallel to the development of technological and methodological potential of biology most of new approaches were employed in studies of Lake Baikal. This review deals mostly with the results obtained during last two decades by means of molecular phylogenetics. The main common features found to date include, first of all, a relatively young age of the most recent common ancestor of the majority of species flocks. Second, it was found that almost all speciation events studied took place in sympatry and according to quite complicated scenarios. The latter is due to the fact that in the course of geological evolution of Lake Baikal there were no or very few episodes of its fragmentation sufficiently long for allopatric mechanisms to leave detectable traces. Reproductive barriers may temporarily disappear causing frequent mitochondrial or nuclear introgressions. As a result, intermediary forms of organisms of unclear taxonomic identity are a common occurrence. Another interesting feature is a practically absolute absence of evidence for co-evolution even of ecologically tightly connected organisms.

Key words: Lake Baikal; biodiversity; speciation.

Исследования эволюционной истории формирования современной фауны Байкала начались уже более века назад (Кожов, 1950) и продолжают до настоящего времени. В настоящем обзоре мы рассмотрим небольшую их часть, а именно те, что, основываясь на использовании методов и подходов молекулярной филогенетики, имели целью выяснить механизмы происхождения современного разнообразия беспозвоночных в Байкале.

Первые результаты в этом направлении получены в конце прошлого века и суммированы в нескольких обзорах (Sherbakov et al., 1998; Cristescu et al., 2010; von Rintelen et al., 2014). В основном они сводились к поискам ответа на долго волновавший многих биологов вопрос о том, молодая или древняя фауна населяет современный Байкал, или, иными словами, о том, удастся ли доказать океанское происхождение современных наиболее разнообразных групп организмов (Brooks, 1950; Kozhov, 1950). Использование гипотезы молекулярных часов и данных о сравнении нуклеотидных последовательностей митохондриальных и ядерных генов позволили довольно быстро установить, что в зависимости от группы изучаемых организмов правы сторонники обеих гипотез – и об относительной молодости, и о древности современной фауны.

Оказалось, что у большинства богатых видами групп животных наиболее недавний общий предок действительно существовал в начале плейстоцена или немного ранее, т. е. в промежутке от примерно пяти до двух миллионов лет назад (Sherbakov, 1999). Это существенно меньше, чем геологическая оценка возраста непрерывно существующего крупного озера в пределах современного Байкала, которая составляет 25–30 млн лет (Мац, 2015). Однако, например, байкальские амфиподы (Sherbakov et al., 1998; MacDonald et al., 2005) и хирономиды рода *Sergentia* (Paroucheva et al., 2003; Кравцова и др., 2015) по возрасту своих ближайших общих предков вполне сравнимы с Байкалом. Чем обусловлена такая разница и в чем состоит причина отсутствия промежуточных звеньев – до сих пор остается без объяснения.

Здесь необходимо уточнить, что под возрастом группы понимают обычно наименьшее возможное время существования общего предка всех последовательностей ДНК, охваченных анализом (tMRCA). Именно эту величину и принято использовать в качестве приблизительной оценки возраста видов. Однако следует отдавать себе отчет в том, что сравнение последовательностей разных генов может приводить к различным результатам (Roos et al., 2011; Oliver, 2013). Чем моложе сравниваемые виды, тем выше риск появления резко различающихся оценок возраста одних и тех же видов, главным образом, из-за неполного расхождения предковых линий и митохондриальной либо ядерной трансгрессии (Bossu, Near, 2009; Roos et al., 2011; Oliver, 2013; Drovetski et al., 2015).

Действительно, при исследовании некоторых относительно молодых букетов видов моллюсков эндемичного семейства гастропод Baicaliidae и полихет рода *Manajunkia* выяснилось, что, несмотря на сравнимую скорость фиксации нуклеотидных замен у использованных в этих исследованиях ядерных и митохондриальных маркеров, топологии соответствующих деревьев генов

резко различны (Перетолчина и др., 2007; Peretolchina et al., 2009; Коваленкова и др., 2015). Такие несоответствия объяснимы митохондриальными и ядерными интрогрессиями, и, как правило, их связывают со временными нарушениями репродуктивного барьера в обстоятельствах, когда один из видов гораздо более многочисленнее, чем другой (Bossu, Near, 2009; Thompson et al., 2010; Nevado et al., 2011; Roos et al., 2011; Drovetski et al., 2015).

На протяжении последних двух десятилетий акцент эволюционных исследований на Байкале сместился с попыток использовать молекулярную филогенетику для целей систематики и/или для оценки возрастов эволюционных событий в сторону изучения микроэволюционных и популяционных процессов. Это обусловлено не только технологическим прогрессом, сделавшим подобные работы выполнимыми, но также тем, что они в наибольшей степени используют преимущества Байкала как уникальной природной эволюционной лаборатории. Популяционные процессы, которые можно исследовать с помощью анализа полиморфизма молекулярных признаков, включают в себя демографические изменения, миграцию и популяционную структуру (подразделенность) вида. Бурная геологическая история Байкала обусловила сильное влияние геологических событий и глобальных экологических изменений на структуру экосистемы. При этом все население Байкала синхронно сталкивалось с глобальными вызовами и все организмы должны были так или иначе в зависимости от своих требований к нише преодолевать эти вызовы (Fazalova et al., 2010).

Поскольку обычно оценка ожидаемого времени существования вида колеблется от сотен тысяч до миллионов лет, филогенетическое дерево даже при применении абсолютно надежных методов оценки возраста не может дать информацию об относительно быстрых филогенетических событиях, происходивших в ответ на относительно короткие флуктуации окружающей среды, которые достигали впечатляющего размаха и оказали влияние на биоту Байкала (Benson et al., 2012; Taylor et al., 2013). Очевидно, в основном у видов, переживших катаклизмы, следует ожидать следов демографических изменений: вымираний, взрывов численности, миграций и нарушений репродуктивных барьеров по отношению к сестринским видам.

Необходимо отметить, что, несмотря на большие линейные размеры, в озере практически нет условий для долговременной пространственной изоляции даже относительно малоподвижных организмов. Поэтому маловероятно аллопатрическое видообразование. Действительно, в настоящее время единственным доказанным в достаточной степени случаем географической изоляции можно считать пару видов амфипод *Eulimnogammarus cyanoides* и *E. messerschmidii* (Bedulina et al., 2014). Хотя в Байкале обнаружено обилие крайне редких видов и локальных эндемиков, утверждать, что даже обитатели побережья Ушканьих островов появились в результате долговременной изоляции от прибрежных видов можно пока лишь предположительно.

Другая яркая особенность эволюционных процессов в Байкале – практически полное отсутствие доказанных коэволюционных связей между совместно встречающимися видами. В нескольких случаях, когда гипотеза

коэволюции кажется очевидной, она не находит доказательств. Пожалуй, самый яркий тому пример – сравнение эволюционных историй байкальских губок семейства Lubomirskiidae и связанных с ними амфипод *Brandtia* (*Dorogostajskia*) *parasitica*. Последние, по данным М. Daneliya и R. Väinölä (2014), состоят из пяти аллопатрических подвидов, и их расстояние от ближайшего представителя того же рода по результатам сравнения последовательностей митохондриального гена *COI* на порядок выше, чем максимальные расстояния внутри эндемичного семейства губок Lubomirskiidae (Schroder et al., 2002). При этом подвиды *B. parasitica* тесно ассоциированы с морфологически различающимися губками. Таксономический ранг губок не установлен, однако сопоставление возрастов показывает, что о коэволюции типа «паразит – хозяин» в этом случае говорить невозможно.

При изучении относительно молодых, но богатых видами групп байкальских эндемиков обнаружена другая интересная особенность. Несмотря на относительно недавнее время существования ближайшего общего предка, их небайкальские сестринские группы оказались весьма далеки. Лучше всего это иллюстрирует группа гастропод, которую принято считать эндемичным семейством Baicaliidae.

В ходе недавнего исследования филогенетических отношений большого числа видов гидробиондных моллюсков с использованием фрагментов генов 16S рРНК, 18S рРНК и первой субъединицы оксидазы цитохрома *c* (*COI*), было показано, что Baicaliidae наиболее близки к амниколидам и могут быть рассмотрены как подсемейство этого семейства, несмотря на значительные генетические дистанции и конвергентное сходство с семейством Purgulidae (Wilke et al., 2013).

В 2003 г. В. Hausdorf и его коллеги (Hausdorf et al., 2003), используя частичные нуклеотидные последовательности генов 12S рРНК и 16S рРНК разных представителей порядка Littorinimorpha совместно с информацией об ископаемых остатках Littorinidae, предположили, что Baicaliidae, Amnicolidae и Vithyniidae дивергировали в юрском или раннемеловом периоде, в то время как несколько исследованных видов байкалий значительно моложе и появились только к началу плейстоцена, не позднее 2,6 млн лет назад (Зубаков и др., 1997).

В первом и наиболее обширном молекулярном исследовании моллюсков семейства Baicaliidae с помощью нуклеотидных последовательностей гена *COI*, опубликованном в 1997 г., полученных для 15 видов байкалий, также было высказано предположение о молодом возрасте радиации и взрывном видообразовании семейства не ранее 2 млн лет назад (Зубаков и др., 1997). Однако в обоих случаях оценки возраста этой группы оказываются очень приближенными из-за отсутствия достоверной информации о скоростях фиксации замен у разных линий гидробиондов.

Поскольку использование одного митохондриального маркера не позволяет получить полностью разрешенное древо байкалий, были предприняты попытки их исследования с помощью ядерных маркеров (интроны генов фосфофруктокиназы и одной из субъединиц АТФ-синтазы). Эти топологии сильно отличались как друг от друга, так и от древа, построенного на основании митохондриаль-

ных данных (Дарикова, Щербаков, 2009; Коваленкова и др., 2013). Кроме того, при изучении внутривидовых отношений рода *Baicalia* (сем. Baicaliidae) также выявлено противоречие между ядерным (межгенным спейсером) и митохондриальным маркерами. Оно свидетельствует о том, что в парах сестринских видов могла происходить частичная или полная трансгрессия митохондриального генома более массового вида в виды с меньшей численностью (Перетолчина и др., 2007; Peretolchina et al., 2009). Таким образом, наблюдаемые несоответствия могут быть связаны не только с быстрыми темпами эволюции и большими генетическими дистанциями до остальных амниколид, что препятствует использованию внешних групп в филогенетических реконструкциях, но и с вероятностью как митохондриальных, так и ядерных трансгрессий.

Байкальские полихеты рода *Manayunkia* делятся на три вида: *M. godlewskii*, *M. zenkewitschii* и *M. baicalensis*. Они различаются по морфологическим признакам: размерам тела половозрелых особей и количеству щупалец, а также по экологическим характеристикам, в первую очередь по субстратным предпочтениям. Так, *M. zenkewitschii* обитает на каменистых и скальных грунтах, *M. godlewskii* – на илистых, *M. baicalensis* предпочитает песчаные грунты (Ситникова и др., 1997; Пудовкина и др., 2014). Байкальские полихеты обитают в домиках-трубочках, которые строят из того же субстрата, на котором живут. Так как они относятся к малоподвижным организмам, которые ведут сидячий или прикрепленный образ жизни, полихеты живут колониями, и вероятность обмена генетической информацией между ними низка. Поэтому можно ожидать высокой степени генетической дифференциации между такими небольшими изолированными популяциями, которая будет увеличиваться прямо пропорционально увеличению расстояний между ними.

И в случае полихет филогенетическое дерево, построенное на основании митохондриальных нуклеотидных последовательностей, существенно отличается от «ядерного». Это несоответствие могло возникнуть по двум плохо различимым и не противоречащим друг другу эволюционным сценариям: сохранения предкового полиморфизма ядерным геномом и/или межвидовой гибридизации. Различия между паттернами изменчивости митохондриальных и ядерных маркеров, в первую очередь, обусловлены тем, что митохондриальный геном гаплоиден и передается только от одного из родителей, следовательно, имеет в четыре раза меньший эффективный размер популяции.

Географическая внутривидовая изменчивость у полихет оказалась весьма высока, однако она сложно устроена. Например, несколько *M. baicalensis*, собранных в районах Нижнеангарска и Хакусов (близко к северной оконечности Байкала), не отличимы друг от друга по обоим маркерам, что вполне ожидаемо. Но *M. godlewskii* из районов пос. Большие Коты и бухты Сенная (существенно севернее Б. Котов) генетически гораздо ближе друг другу (средние генетические дистанции отличаются примерно в пять раз), чем полихеты из Больших Котов и пади Жилище, которые географически расположены гораздо ближе, всего в двух километрах. Такая подразделенность может быть связана с рельефом дна в пади Жилище. Корреляция

Спирмена между дистанциями по разным маркерам для *M. godlewskii* не высока (0,64) (Коваленкова и др., 2015).

Байкальские эндемичные губки (сем. *Lubomirskiidae*) являются важнейшим компонентом бентосного сообщества озера, зачастую превышая по биомассе другие группы зообентоса вместе взятые, особенно в литорали (Кожов и др., 1969; Кожов, 1972). Для байкальских эндемичных губок характерно низкое видовое разнообразие. Согласно действующей классификации (Ефремова, 2001), семейство *Lubomirskiidae* включает в себя 4 рода и 13 видов. Важно отметить, что байкальские губки обладают высокой видовой и индивидуальной морфологической изменчивостью, поэтому некоторые признаки видов, а иногда и родов перекрываются, тем самым «размывая» морфологические границы таксонов, что делает их видовую идентификацию затруднительной, а порой и невозможной. Иногда мы наблюдаем переходные формы, которые сочетают признаки двух видов.

В результате исследований морфологических особенностей и жизненного цикла губок (Ефремова, 1986; Ефремова, Гуреева, 1989) показано сходство *Lubomirskiidae* с представителями космополитного семейства *Spongillidae*. Анализ нуклеотидных последовательностей участка гена *COI* К ядерного генома (Itskovich et al., 2007, 2008) пресноводных губок показал, что семейство *Lubomirskiidae* монофилетично, а *Spongillidae* составляют предковую группу по отношению к ним. Выявлено, что у байкальских губок скорость эволюции гена *COI* сопоставима с таковой у ядерного гена 18S рРНК, что значительно ниже скорости накопления нуклеотидных замен в аналогичных генах других животных (Itskovich et al., 2006). Позднее на основе последовательностей митохондриального генома *Lubomirskia baicalensis* была подсчитана скорость эволюции мтДНК байкальских губок, которая равна $(0,5-1,6) \times 10^{-9}$, что, скорее, сопоставимо со скоростью эволюции мтДНК у растений, нежели у билатеральных животных. Скорость накопления замен в некодирующих участках мтДНК в несколько раз выше, чем в кодирующих (Lavrov, 2010). Подсчет был произведен исходя из предположения о дивергенции байкальских губок от общего предка около 310 млн лет назад, согласно палеонтологическим данным (Weinberg et al., 2003; Veynberg, 2009). Гипотеза об относительной молодости *Lubomirskiidae* была подтверждена с помощью молекулярно-генетического анализа кодирующих последовательностей мтДНК. Более того, показано, что наиболее вероятное время дивергенции современных видов от общего предка – 2,3 (3,6–1,3) млн лет назад (Maikova et al., 2015). Учитывая низкую скорость накопления нуклеотидных замен и относительную молодость *Lubomirskiidae*, можно предположить неполное разделение линий, что и дает возможность объяснить большое количество переходных морфологических форм между видами.

Высокое генетическое сходство кодирующих последовательностей мтДНК не позволяет использовать отдельные гены для решения филогенетических и эволюционных задач внутри семейства *Lubomirskiidae*. К сожалению, такие ядерные маркеры, как ITS-районы и 18S рРНК, тоже для этого не пригодны. Для этой цели перспективно совместное использование некодирующих последовательно-

стей мтДНК и ряда митохондриальных генов и необходим поиск дополнительных ядерных маркеров.

Благодарности

Работа частично поддержана государственной бюджетной темой № 0345-2014-0005 «VI.61.1.3 Теоретическое и экспериментальное исследование популяционной и экологической генетики байкальских эндемиков», а также грантами РФФИ № 15-04-03848 и 14-44-04138.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Дарикова Ю.А., Щербаков Д.Ю. Эволюция интрона гена фосфофруктокиназы у брюхоногих моллюсков семейства *Baicaliidae*. Молекулярная биология. 2009;43(5):838-844.
- Ефремова С.М. Эмбриология губок семейства *Lubomirskiidae* и вопросы происхождения спонгиозауны Байкала. Онтогенез. 1986; 17(14):427-428.
- Ефремова С.М. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Новосибирск, 2001;1(1).
- Ефремова С.М., Гуреева М.А. Проблема происхождения и эволюции байкальских губок: материалы 1-й Верещагинской Байкальской международной конференции. Иркутск, 1989;22-23.
- Зубаков Д.Ю., Щербаков Д.Ю., Ситникова Т.Я. Анализ филогенетических взаимоотношений байкальских эндемичных моллюсков сем. *Baicaliidae* на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента митохондриального гена *COI*. Молекулярная биология. 1997;31(6):32-36.
- Коваленкова М.В., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю. Генетическая и морфологическая диверсификация гастропод семейства *Baicaliidae*. Экологическая генетика. 2013;11(4):3-11.
- Коваленкова М.В., Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю. Несоответствие филогенетических сигналов ядерного и митохондриального молекулярных маркеров для полихет р. *Manayunkia*. Актуальные проблемы науки Прибайкалья. 2015;1:144-148.
- Кожов М.М. Пресные воды Восточной Сибири: бассейн Байкала, Ангары, Витима, верхнего течения Лены и Нижней Тунгуски. Иркутск, 1950.
- Кожов М.М. Очерки по байкаловедению. Иркутск, 1972.
- Кожов М.М., Ижболдина Л.А., Каплина Г.С., Окунева Г.Л. Бентос юго-восточного побережья озера Байкал. Биологическая продуктивность водоемов Сибири: докл. Первого совещ. по биол. продуктивности водоемов Сибири. Иркутск, 6–9 окт. 1966 г. М., 1969;29-37.
- Кравцова Л.С., Букин Ю.С., Перетолчина Т.Е., Щербаков Д.Ю. Генетическая дифференциация популяций байкальского эндемика *Sergentia baicalensis* Tshern. (Diptera, Chironomidae). Генетика. 2015;51(7):826-829.
- Мац В.Д. Байкальский рифт: плиоцен (миоцен) – четвертичный эпизод или продукт длительного развития с позднего мела под воздействием различных тектонических факторов. Обзор представлений. Геодинамика, тектонофизика. 2015;6(4):467-489. DOI 10.5800/GT-2015-6-4-0190.
- Перетолчина Т.Е., Букин Ю.С., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю. Генетическая дифференциация эндемичного байкальского моллюска *Baicalia carinata* (Mollusca, Caenogastropoda). Генетика. 2007;43(12):1667-1675.
- Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Матвеев А.Н., Щербаков Д.Ю. Родственные связи байкальских полихет рода *Manayunkia* (Polichaeta: Sedentaria: Sabellidae) по данным анализа *COI* с анализом истории расселения. Экологическая генетика. 2014;12(3): 32-40.

- Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю., Харченко В.В. О таксономическом статусе полихет рода *Manayunkia* (Sabellidae, Fabriciinae) из Байкала. Зоол. журнал. 1997;76(1):16-27.
- Bedulina D.S., Takhteev V.V., Pogrebnnyak S.G., Govorukhina E.B., Madyarova E.V., Lubyaga Y.A., Vereshchagina K.P., Timofeyev M.A., Luckenbach T. On *Eulimnogammarus messerschmidtii* sp. n. (Amphipoda: Gammaridea) from Lake Baikal, Siberia, with redescription of *E. cyanooides* (Sowinsky) and remarks on taxonomy of the genus *Eulimnogammarus*. Zootaxa. 2014;3838(5):518-544.
- Benson B.J., Magnuson J.J., Jensen O.P., Card V.M., Hodgkins G., Korhonen J., Livingstone D.M., Stewart K.M., Weyhenmeyer G.A., Granin N.G. Extreme events, trends, and variability in northern hemisphere lake-ice phenology (1855-2005). Climatic Change. 2012;112(2):299-323.
- Bossu C.M., Near T.J. Gene trees reveal repeated instances of mitochondrial DNA introgression in orangethroat darters (Percidae: Etheostoma). Syst. Biol. 2009;58(1):114-129.
- Brooks J.L. Speciation in ancient lakes. Q. Rev. Biol. 1950;25(2):131-176.
- Cristescu M.E., Adamowicz S.J., Vaillant J.J., Haffner D.G. Ancient lakes revisited: from the ecology to the genetics of speciation. Mol. Ecol. 2010;19(22):4837-4851.
- Daneliya M.E., Väinölä R. Five subspecies of the *Dorogostaiskia parasitica* complex (Dybowsky) (Crustacea: Amphipoda: Acanthogammaridae), epibionts of sponges in Lake Baikal. Hydrobiologia. 2014;239(1):95-117.
- Drovetski S.V., Semenov G., Red'kin Y.A., Sotnikov V.N., Fadeev I.V., Koblik E.A. Effects of asymmetric nuclear introgression, introgressive mitochondrial sweep, and purifying selection on phylogenetic reconstruction and divergence estimates in the Pacific clade of *Locustella* warblers. PLoS One. 2015;10(4):e0122590. DOI 10.1371/journal.pone.0122590.
- Fazalova V., Nevado B., Peretolchina T., Petunina J., Sherbakov D. When environmental changes do not cause geographic separation of fauna: differential responses of baikalian invertebrates. BMC Evol Biol. 2010;10:320.
- Hausdorf B., Ropstorff P., Riedel F. Relationships and origin of endemic Lake Baikal gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea) based on mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003;26:435-443.
- Itskovich V., Belikov S., Efremova S., Masuda Y. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of *COXI* gene. Hydrobiologia, Springer Netherlands. 2006;568(1):155-159.
- Itskovich V., Belikov S., Efremova S., Masuda Y., Perez T., Alivon E., Borchiellini C., Boury-Esnault N. Phylogenetic relationships between freshwater and marine haplosclerida (Porifera, Demospongiae) based on the full length 18S rRNA and partial *COXI* gene sequences. Porifera Research – Biodiversity, Innovation and Sustainability, 2007;1-9.
- Itskovich V., Gontcharov A., Masuda Y., Nohno T., Belikov S., Efremova S., Meixner M., Janussen D. Ribosomal ITS-sequences allow resolution of freshwater sponge phylogeny with alignments guided by secondary structure prediction. J. Mol. Evol. 2008;67(6):608-620.
- Lavrov D.V. Rapid proliferation of repetitive palindromic elements in mtDNA of the endemic baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis*. Mol. Biol. Evol. 2010;27(4):757-760.
- MacDonald K.S., Yampolsky L., Duffy J.E. Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal. Mol. Phylogenet. Evol. 2005;35(2):323-343.
- Maikova O., Khanaev I., Belikov S., Sherbakov D. Two hypotheses of the evolution of endemic sponges in Lake Baikal (Lubomirskiidae). J. Zoolog. Syst. Evol. Res. 2015;53(2):175-179.
- Nevado B., Fazalova V., Backeljau T., Hanssens M., Verheyen E. Repeated unidirectional introgression of nuclear and mitochondrial DNA between four congeneric tanganyikan cichlids. Mol. Biol. Evol. 2011;28(8):2253-2267.
- Oliver J.C. Microevolutionary processes generate phylogenomic discordance at ancient divergences. Evolution. 2013;67(6):1823-1830.
- Papoucheva E., Proviz V., Lambkin C., Goddeeris B., Blinov A. Phylogeny of the endemic baikalian *Sergentia* (Chironomidae, Diptera). Mol. Phylogenet. Evol. 2003;29(1):120-125.
- Peretolchina T.E., Sitnikova T.Y., Novikov A., Sherbakov D.Y. The history of changing ecological niches during speciation in endemic mollusks of genus *Baicalia* (Ed. S. Trajanovski, T. Wilke, C. Albrecht, G. Kostoski). Abstracts of the International Symposium Speciation in Ancient Lakes, SIAL 5. Ohrid, 2009:82-86.
- Roos C., Zinner D., Kubatko L.S., Schwarz C., Yang M., Meyer D., Nash S.D., Xing J., Batzer M.A., Brameier M., Leendertz F.H., Ziegler T., Perwitasari-Farajallah D., Nadler T., Walter L., Osterholz M. Nuclear versus mitochondrial DNA: evidence for hybridization in colobine monkeys. BMC Evol. Biol. 2011;11:77.
- Schröder C., Efremova S., Itskovich V., Belikov S., Masuda Y., Krasiko A., Muller I.M., Muller W.E.G. Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake Baikal. J. Zool. Syst. Evol. Research. 2002;40:1-7.
- Sherbakov D. Molecular phylogenetic studies on the origin of biodiversity in Lake Baikal. Trends Ecol. Evol. 1999;14(3):92-95.
- Sherbakov D.Y., Kamaltynov R.M., Ogarkov O.B., Verheyen E. Patterns of evolutionary change in baikalian gammarids inferred from DNA sequences (Crustacea, Amphipoda). Mol. Phylogenet. Evol. 1998;10(2):160-167.
- Taylor R.A., White A., Sherratt J.A. How do variations in seasonality affect population cycles? Proc. Biol. Sci. 2013;280(1754). DOI 10.1098/rspb.2012.2714.
- Thompson S.L., Lamothe M., Meirmans P.G., Périnet P., Isabel N. Repeated unidirectional introgression towards *Populus balsamifera* in contact zones of exotic and native poplars. Mol. Ecol. 2010;19(1):132-145.
- Veynberg E. Fossil sponge fauna in Lake Baikal region. Prog. Mol. Subcell Biol. 2009;47:185-205.
- von Rintelen T., Marwoto R.M., Haffner G.D., Herder F. Preface: Speciation research in ancient lakes – classic concepts and new approaches. Hydrobiologia. 2014;739:1-6.
- Weinberg E., Weinberg I., Efremova S., Tanichev A., Masuda Y. Late Pliocene Spongal Fauna in Lake Baikal (from material from the Deep Drilling Core BDP-96-1). Tokyo: Springer-Verlag, 2003. DOI 10.1007/978-4-431-67859-5_18.
- Wilke T., Haase M., Hershler R., Liu H-P., Misof B., Ponder W. Pushing short DNA fragments to the limit: Phylogenetic relationships of 'hydrobioid' gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea). Molecular Phylogenetics and Evolution. 2013;66(3):715-736.

Хромосомы и видообразование у туко-туко (*Ctenomys*, Hystricognathi, Rodentia)

А.А. Торгашева^{1,2}, Е.А. Башева¹, М.Х. Гомес Фернандес³, П. Мироль³, П.М. Бородин^{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 «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Новосибирск, Россия

³ Аргентинский музей естественных наук им. Бернардино Ривадавия, Буэнос-Айрес, Аргентина

Южноамериканские грызуны рода туко-туко (*Ctenomys*) представляют собой интересную модель видообразования. Их строгая территориальность и одиночный образ жизни под землей, сильно фрагментированные ареалы, низкая миграционная активность послужили причинами их очень быстрой радиации. В настоящее время описано около 60 видов этого рода. Его представителей обнаруживают в самых разных местообитаниях, от гор в Андах до прибрежных дюн Атлантики, от влажных степей Пампы до пустынь Чако. Туко-туко отличаются очень высоким уровнем хромосомного полиморфизма и политипизма на основе Робертсоновских и полно-плечевых реципрокных транслокаций и инверсий и поэтому могут быть использованы для тестирования разных версий гипотезы хромосомного видообразования. Классическая версия этой гипотезы делает акцент на стерильности гибридов, обусловленной неправильным или неполным синапсисом хромосом у гетерозигот по перестройкам, гибелью зародышевых клеток, неправильной сегрегацией хромосом и генерацией несбалансированных гамет. В рамках современной версии хромосомного видообразования предполагается, что сокращение потока генов через хромосомные гибридные зоны обусловлено подавлением рекомбинации у гибридов вокруг точек разрыва перестроек, различающих родительские виды. Полевые исследования не выявили сильных негативных эффектов хромосомной гетерозиготности на приспособленность. Эти результаты поставили под сомнение валидность классической версии гипотезы. Анализ поведения хромосом в профазе мейоза у гетерозигот по перестройкам выявил у них значимые изменения в частоте и распределении рекомбинации: супрессию кроссинговера в районе точек разрыва и дистализацию хиазм. Эти изменения могут модулировать поток генов между хромосомными расами и усиливать дивергенцию, возникшую за счет пространственной изоляции. Эти данные подтверждают рекомбинационную модель хромосомного видообразования.

Ключевые слова: видообразование; туко-туко; хромосомы; иммунолокализация; мейоз; рекомбинация.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Торгашева А.А., Башева Е.А., Гомес Фернандес М.Х., Мироль П., Бородин П.М. Хромосомы и видообразование у туко-туко (*Ctenomys*, Hystricognathi, Rodentia). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):408-415. DOI 10.18699/VJ16.170

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Torgasheva A.A., Basheva E.A., Gomez Fernandez M.J., Mirol P., Borodin P.M. Chromosomes and speciation in tuco-tuco (*Ctenomys*, Hystricognathi, Rodentia). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):408-415. DOI 10.18699/VJ16.170

УДК 575.858:576.316

Поступила в редакцию 07.07.2016 г.

Принята к публикации 26.07.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

✉ e-mail: borodin@bionet.nsc.ru

Chromosomes and speciation in tuco-tuco (*Ctenomys*, Hystricognathi, Rodentia)

A.A. Torgasheva^{1,2}, E.A. Basheva¹, M.J. Gomez Fernandez³, P. Mirol³, P.M. Borodin^{1,2} ✉

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Argentine Museum of Natural Sciences "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires, Argentina

Tuco-tucos, South American rodents of the genus *Ctenomys* represent an interesting model of speciation. Their strict territorial and solitary life under the earth, vast but highly fragmented habitats, low migration activity were the causes of their very fast radiation. About 60 species of this genus have been described. They are found in a variety of habitats, from the mountains of the Andes to the coastal dunes of the Atlantic, from humid steppes of Pampas to dry deserts of Chaco. Tuco-tucos have a very high level of chromosomal polymorphism and polytypism based on Robertsonian and whole-arm reciprocal translocations and inversions, and can therefore be used to test different versions of chromosomal speciation hypothesis. The classic version of this hypothesis emphasizes the sterility of the hybrids, due to incorrect or incomplete chromosome synapsis in heterozygotes for rearrangements, germ cells death, chromosome nondisjunction and the generation of unbalanced gametes. The modern version of chromosomal speciation hypothesis suggests that the reduction of gene flow across chromosomal hybrid zones is due to the suppression of recombination in hybrids around the break points of rearrangements distinguishing the parental species. Field studies have not revealed strong negative effects of chromosomal heterozygosity on the fitness of the carriers. These results cast doubt on the validity of the classic version of the hypothesis. Analysis of chromosome behavior in the meiotic prophase in the chromosomal heterozygotes revealed significant changes in the frequency and distribution of recombination: crossingover suppression around the breakpoint and chiasma distalization. These changes can modulate the flow of genes between chromosomal races and amplify the divergence which has arisen due to spatial isolation. These data confirm the recombinational model of chromosomal speciation.

Key words: speciation; tuco-tuco; chromosomes; immunolocalization; meiosis; recombination.

Процессы, которые ведут к появлению новых видов – видообразованию, играют центральную роль в эволюции биоразнообразия. Особенно интересны и сложны для исследования самые ранние стадии видообразования. На этих этапах трудно определить, когда, где и почему та или иная популяция или группа популяций становится независимой эволюционной линией, в какой период и на какой территории та или иная линия отделяется от остальных популяций своего вида и выходит на уникальную эволюционную траекторию и какие факторы играют решающую роль в этом процессе. Самыми информативными для решения такого рода вопросов являются случаи относительно недавнего видообразования, когда границы видов размыты и сложно разграничить статус локальных популяций, их принадлежность одному или разным видам.

Для изучения путей и механизмов видообразования особый интерес представляет отряд грызунов, поскольку они составляют около половины всех видов млекопитающих, описанных на сегодняшний день (Wilson, Reeder, 2005). В данной статье мы рассмотрим особенности видообразования у южноамериканских грызунов рода туко-туко (*Stenomys*) (рис. 1), единственного рода в семействе Stenomyidae (Hystricognathi, Rodentia), обратив особое внимание на роль хромосомных перестроек в этом процессе.

Распространение и образ жизни рода *Stenomys*

Туко-туко – полностью подземные обитатели. Они проводят большую часть своего времени под землей, независимо от типа среды обитания и местоположения (рис. 2). Норы обеспечивают туко-туко однородной средой, где температура и влажность остаются постоянными при любых внешних условиях (Reig et al., 1990; Busch et al., 2000).

Представители рода *Stenomys* населяют всю южную часть Южной Америки, включая Бразилию, Боливию, Перу, Парагвай, Уругвай, Чили и Аргентину. Их обнаруживают в самых разных местообитаниях, от Центральноандской Пуны на высоте 4000 м над уровнем моря до прибрежных дюн Атлантики, от влажных степей Пампы до пустынь Чако и Монте (рис. 3).

Туко-туко встречаются в природе в фрагментированных средах и имеют ограниченную способность к расселению (Busch et al., 2000). Они, как правило, образуют небольшие популяции (демы) с низкой генетической изменчивостью внутри групп и высокой межпопуляционной дивергенцией (Wlasiuk et al., 2003). Большинство видов одиночные с выраженным территориальным поведением. Каждая особь живет в индивидуальной, строго охраняемой системе нор. Исключение составляют только самки и их потомство некоторое время после отъема. Известно всего два социальных вида туко-туко. У *S. peruanus* самцы одиночные, а самки образуют колонии. У *S. sociabilis* от двух до шести взрослых самок и взрослый самец совместно населяют систему нор, участвуют в фуражировке, копке и охране нор. У этого вида описана система тревожной сигнализации в ответ на проникновение хищников (Pearson, Christie, 1985; Lacey et al., 1997; Lacey, Wiczorek, 2004). Такой образ жизни ведет к сильной генетической и простран-

ственной структурированности популяций туко-туко, значительной внутри- и межвидовой дивергенции за счет дрейфа генов (Reig et al., 1990; Lessa, Cook, 1998; Lessa, 2000; Slamovits et al., 2001; Mora et al., 2006).

Эволюционная история и современная дивергенция рода *Stenomys*

В палеонтологической летописи представители семейства Stenomyidae впервые появляются в конце миоцена. В конце плиоцена они демонстрируют отчетливое увеличение разнообразия, за которым следует вымирание всех родов за исключением рода *Stenomys*. В плейстоцене наблюдается интенсивный кладогенез и значительная диверсификация туко-туко (Reig et al., 1990; Verzi, 2008; Verzi et al., 2010).

Поскольку род *Stenomys* появился в конце плиоцена, его нынешнее видовое разнообразие может быть объяснено только очень высокими темпами видообразования (Reguero et al., 2007; Verzi et al., 2010; Parada et al., 2011). На основе молекулярных данных возраст рода *Stenomys* оценивается как 3,7 млн лет (Castillo et al., 2005). Это хорошо согласуется с палеонтологическими данными, которые свидетельствуют о том, что расхождение между Stenomyidae и Octodontidae произошло не ранее чем 9 млн лет назад (Verzi, 1999, 2002; Verzi et al., 2010).

Род *Stenomys* включает в себя около 60 видов и, таким образом, представляет собой наиболее богатую видами группу среди подземных грызунов (Reig et al., 1990; Lessa, Cook, 1998; Castillo et al., 2005; Woods, Kilpatrick, 2005). Некоторые формы рода *Stenomys* до сих пор не имеют формального описания. Многие номинальные виды были охарактеризованы по одному или нескольким образцам. Эта классификация была основана главным образом на анализе морфологических признаков, таких как особенности морфологии черепа, окраски меха и размера тела. Со временем для классификации стали использовать особенности кариотипов (Reig, Kiblicky, 1969), морфологию сперматозоидов (Feito, Gallardo, 1982), частоты аллозимных локусов (Sage et al., 1986) и молекулярных маркеров (Lessa, Cook, 1998; Mascheretti et al., 2000; Giménez et al., 2002; Castillo et al., 2005; Mirol et al., 2010; Parada et al., 2011).

В пределах рода *Stenomys* на основе биогеографических, морфологических и молекулярных характеристик выделяют несколько отчетливых филогенетических линий (Reig et al., 1990). Первые попытки определить филогенетические отношения между различными линиями на основе анализа последовательностей митохондриального цитохрома b не увенчались успехом (Lessa, Cook, 1998; Mascheretti et al., 2000). Область неопределенности лежит в основе данной клады. Филогения имеет форму звезды, что указывает на взрывное видообразование и почти одновременное появление нескольких крупных филогенетических линий (Lessa, Cook, 1998). Недавно А. Парада и сотрудники (Parada et al., 2011) исследовали филогенетические связи 38 видов и 12 неописанных форм туко-туко, используя 83 полные последовательности митохондриального цитохрома b. Они нашли восемь относительно хорошо поддерживаемых видовых групп: *boliviensis*, *magellanicus*, *frater*, *opimus*, *torquatus*,



Рис. 1. Туко-туко *C. dorbignyi*, Корриентес, Аргентина.
Фото М.Х. Гомес Фернандес.



Рис. 2. Туко-туко *C. flamarioni* в типичном местообитании, Рио Гранде до Сул, Бразилия.

Фото К. Тимм (Cláudio Timm <http://flickr.com/photos/32674493@N04/5346736979>). Это изображение распространяется под лицензией Creative Commons Attribution-Share Alike 2.0 Generic).

tucumanus, *mendocinus* и *talarum*, которые были названы по имени самых старых видов в каждой группе. Отношения внутри большинства видовых групп, за исключением двух последних, имели слабую поддержку. Эти результаты подтверждают предыдущие выводы о высоких темпах диверсификации в основе клады туко-туко, хотя причина этой диверсификации остается неясной.

Экстраординарная скорость видообразования среди туко-туко, по-видимому, обусловлена совместным действием многих факторов. К ним относят сильно фрагментированные ареалы, жесткую пространственную изоляцию локальных популяций, ограниченную подвижность и низкий уровень миграций, низкую эффективную численность популяций, строгую территориальность одних видов и ригидную систему социально-структурированных брачных связей (Reig et al., 1990). Одним из важнейших факторов быстрого видообразования многие авторы считают высокую внутри- и межвидовую кариотипическую гетерогенность (Ortells, 1995).



Рис. 3. Карта типовых территорий видов рода *Ctenomys*, по данным <http://vertebrates.si.edu/msw/mswcfapp/msw/> (запрос 06.07.2016).

1 – *C. leucodon*, 2 – *C. steinbachi*, 3 – *C. opimus*, 4 – *C. brasiliensis*, 5 – *C. dorsalis*, 6 – *C. sylvanus*, 7 – *C. fulvus*, 8 – *C. argentinus*, 9 – *C. tuconax*, 10 – *C. dorbignyi*, 11 – *C. flamarioni*, 12 – *C. roigi*, 13 – *C. minutus*, 14 – *C. perrensi*, 15 – *C. torquatus*, 16 – *C. azarae*, 17 – *C. bergi*, 18 – *C. tucumanus*, 19 – *C. mendocinus*, 20 – *C. rionegrensis*, 21 – *C. puncti*, 22 – *C. pearsoni*, 23 – *C. australis*, 24 – *C. talarum*, 25 – *C. porteousi*, 26 – *C. sociabilis*, 27 – *C. haigi*, 28 – *C. colburni*, 29 – *C. magellanicus*.

Карта создана с использованием сервиса Google Карты ©. Картографические данные © 2016, Google изображения © 2016 NASA, Terra Metrics. Карта доступна по адресу <https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=1ofYXIPZO0d8e6byUMi7vkdrjM40>

Кариотипическая изменчивость рода *Ctenomys*

Туко-туко образуют одну из самых кариотипически разнообразных клад млекопитающих, известных к настоящему времени. Их диплоидные хромосомные числа варьируют в диапазоне от $2n = 10$ у *C. steinbachi* до $2n = 70$ у *C. dorbignyi* и *C. pearsoni* (Kiblicky et al., 1977; Gallardo, 1991; Reig et al., 1992; Ortells, 1995; Argüelles et al., 2001).

Большинство видов имеет стабильный видоспецифичный кариотип. Однако существуют группы видов с одинаковым числом хромосом. Так, $2n = 48$ обнаружено у *C. mendocinus*, *C. porteousi*, *C. australis*, *C. azarae*,

C. flamarioni (Massarini et al., 1991; Freitas, 1994; Massarini, Freitas, 2005), $2n = 26$ – у *C. opimus*, *C. fulvus* и *C. robustus* (Gallardo, 1979). С другой стороны, группа видов "*perrensi*" весьма гетерогенна по кариотипам. Диплоидное число хромосом в этой группе варьирует от 40 до 70. Изменчивость кариотипа у туко-туко обусловлена фиксацией различных хромосомных перестроек: робертсоновских транслокаций, перичентрических инверсий и изменений гетерохроматина (добавления или делеции С-позитивного материала) (Reig, Kiblicky, 1969; Cook et al., 1990; Ortells et al., 1990; Giménez et al., 2002; Novello, Villar, 2006). Более того, хромосомный полиморфизм наблюдается и внутри многих видов туко-туко (Massarini et al., 2002; Freitas, 2007; Caraballo et al., 2012; Lopes et al., 2013). Такое широкое кариотипическое разнообразие послужило основой для предположений, что именно оно и стало причиной быстрого видообразования у туко-туко.

Хромосомные перестройки и видообразование в роде *Ctenomys*

Гипотеза хромосомного видообразования предполагает, что фиксация различных хромосомных перестроек в различных локальных популяциях одного вида может способствовать видообразованию. Традиционная версия этой гипотезы делала акцент на стерильности или снижении плодовитости гибридов, которые могли быть вызваны неправильным или неполным синапсисом хромосом, участвующих в перестройках, которые, в свою очередь, могли приводить к гибели зародышевых клеток или неправильной сегрегации хромосом и генерации несбалансированных гамет (White, 1968, 1969, 1977, 1978; King, 1987, 1995). Современная версия гипотезы хромосомного видообразования делает акцент не на стерильность или сниженную приспособленность гетерозигот, а на подавление рекомбинации вокруг точек разрыва перестроек у гетерозигот, которое, в свою очередь, ведет к сокращению потока генов через хромосомные гибридные зоны (Rieseberg, 2001; Livingstone, Rieseberg, 2004; Faria, Navarro, 2010; Jackson, 2011).

Эта гипотеза была проверена на различных видах растений и животных. В исследованиях на млекопитающих продемонстрировано снижение приспособленности гибридов между кариотипически различными популяциями или подвидами (Axenovich et al., 1998; Rogatcheva et al., 1998; Castiglia, Sapanna, 1999, 2000; Sapanna, Castiglia, 2004; Borodin et al., 2006; Castiglia, 2014). Однако следует отметить, что в тех случаях, когда был проведен детальный генетический анализ, было надежно показано, что гибридная стерильность определялась генетической несовместимостью, а не хромосомной гетерозиготностью (Mercer et al., 1992; Axenovich et al., 1998; Borodin et al., 2006; Bhattacharyya et al., 2013). Эти результаты можно рассматривать как аргументы против классического варианта гипотезы хромосомного видообразования. В то же время получены свидетельства в пользу современной версии этой гипотезы. Существенные изменения в рекомбинации наблюдались у мышей и землероек – носителей простых и сложных гетерозигот по робертсоновским транслокациям по сравнению с гомозиготами (Searle, 1986, 1993; Wallace et al., 1992; Bidau et al., 2001; Dumas,

Britton-Davidian, 2002; Borodin et al., 2008; Merico et al., 2013; Dumas et al., 2015).

Несмотря на очевидную привлекательность гипотезы о том, что хромосомный полиморфизм, широко распространенный среди туко-туко, является причиной быстрого видообразования в этом роде, предпринято на удивление мало попыток проверить эту гипотезу и выяснить роль, которую хромосомные перестройки могут играть в генетическом структурировании популяций и видов рода *Ctenomys*. Детальное исследование вклада хромосомной дивергенции в генетическую дифференциацию природных популяций было проведено на *C. minutus*. Этот вид населяет узкую прибрежную равнину на юге Бразилии, которая имеет сложную геологическую историю. Она разделена сейчас и разделялась в разные периоды в прошлом несколькими потенциальными географическими барьерами (рис. 3, 13). Кариотип *C. minutus* весьма полиморфен. На сегодня описано 45 различных кариотипов. Диплоидное число варьирует в диапазоне от 42 до 50, а число плеч аутосом – от 68 до 80. Внутри вида выделяется восемь парапатрически распределенных хромосомных рас, которые образуют шесть гибридных зон, в них и наблюдается самое высокое разнообразие кариотипов (Freitas, 1997; Gava, Freitas, 2002, 2003; Freygang et al., 2004; Castilho et al., 2012). При этом $2n = 50$ находится на северном и южном концах ареала, постепенно уменьшаясь к середине распределения до $2n = 42$ за счет робертсоновских и тандемных слияний/разделений и одной перичентрической инверсии. А. Гава и Т. Фрейтас (Gava, Freitas, 2002, 2003), исследуя одну из гибридных зон, не обнаружили ни стерильности хромосомных гетерозигот, ни явного снижения их приспособленности у *C. minutus*. Широкое филогеографическое исследование данного вида не выявило существенного вклада цитогенетических характеристик локальных популяций на их генетическую подразделенность (Lopes et al., 2013). В исследованиях на *C. pearsoni* также не найдено стерильности или снижения приспособленности у гетерозигот по хромосомным перестройкам (Tomasco et al., 2007). Таким образом, результаты полевых наблюдений поставили под сомнение валидность классической версии гипотезы, которая базировалась на предположении о стерильности или негативном гетерозисе по приспособленности у структурных гетерозигот.

В этом контексте особую актуальность приобрели исследования эффектов гетерозиготности по хромосомным перестройкам на поведение хромосом в мейозе у туко-туко. Нам известны две работы такого рода (Lanzone et al., 2007; Basheva et al., 2014). С. Ланзоне с коллегами (Lanzone et al., 2007) проверяли предположение о том, что гибриды между разными хромосомными расами *C. perrensi* (рис. 3, 14), различающимися по хромосомным перестройкам, могут обладать сниженной плодовитостью из-за нарушений в спаривании хромосом. В большинстве сперматоцитов у гетерозигот по робертсоновским транслокациям они обнаружили нормальный синапсис гомологичных хромосом. В редких случаях у гетерозигот по нескольким транслокациям наблюдался частичный асинапсис в прицентромерных районах. Число хиазм у простых робертсоновских гетерозигот, полученных из природных популяций видовой группы *C. perrensi*, не

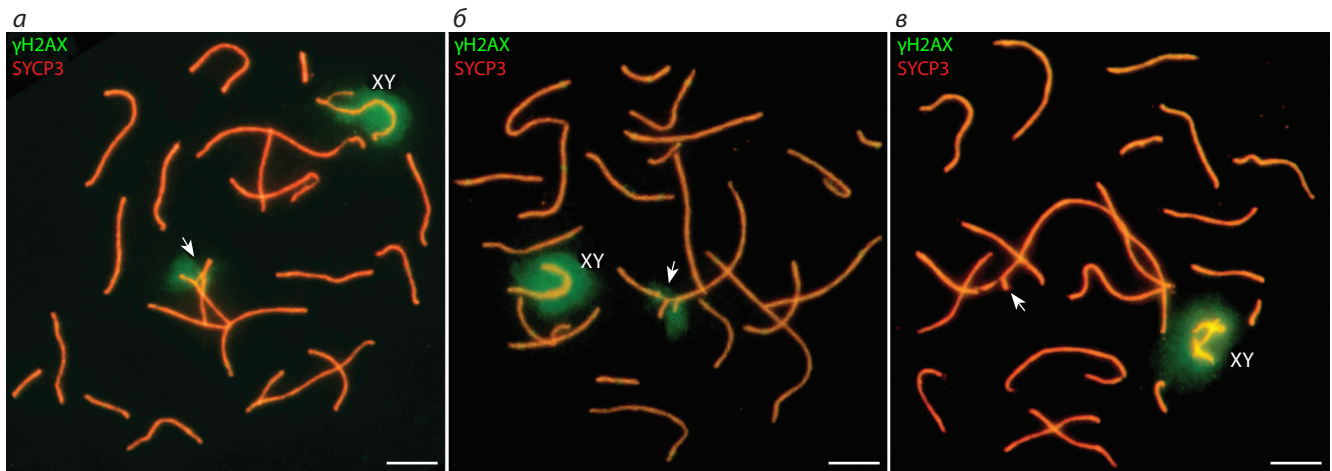


Рис. 4. Иммунолокализация SYCP3 и γ H2A.X на распластанных сперматоцитах *C. talarum*, гетерозиготного по двум робертсоновским слияниям с монобрахиальной гомологией: а – ранняя пахитена; б – средняя; в – поздняя.

Стрелки указывают на квадрилвалент А1/РbА1В3/РbВ2В3/В3, XY – половой бивалент. Масштаб 5 мкм. Из (Basheva et al., 2014), с разрешения Springer © 2014.

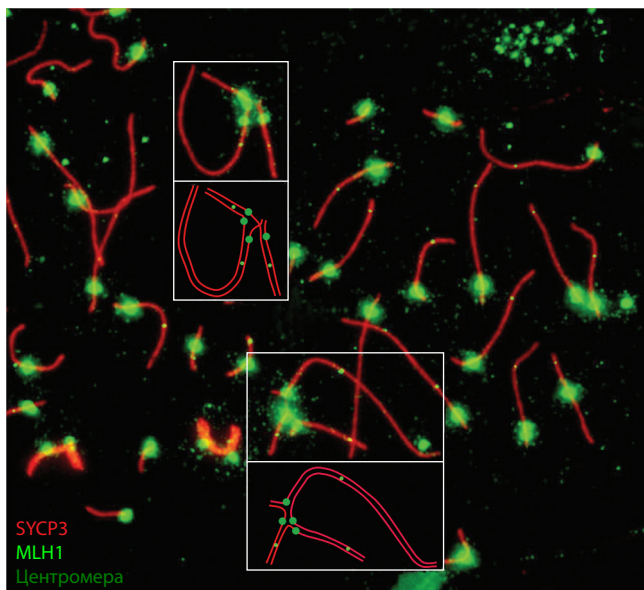


Рис. 5. Иммунолокализация SYCP3 и MLH1 на распластанных сперматоцитах *C. talarum*, гетерозиготного по двум робертсоновским слияниям с монобрахиальной гомологией.

Фото Е.А. Башевой. Прямоугольниками отмечены синаптические конфигурации квадрилвалентов А1/РbА1В3/РbВ2В3/В3 и их схематические изображения. Масштаб 5 мкм.

отличалось от числа, определенного у нормальных гомозигот по акроцентрическим хромосомам. Авторы пришли к выводу, что накопление робертсоновских транслокаций в локальных популяциях не является причиной дивергенции в группе видов *C. perrensi*.

Этот вывод подтверждается низкой молекулярной дифференциацией и наличием указаний на поток генов между различными популяциями *C. perrensi*, имеющими вариацию в числе хромосом от 42 до 70. При этом оказалось, что парапатрические популяции, различающиеся по

числу хромосом, демонстрируют большее генетическое сходство, чем аллопатрические популяции, идентичные по кариотипам (Giménez et al., 2002; Mirol et al., 2010; Fernández et al., 2012).

Вторая работа по изучению эффектов гетерозиготности по хромосомным перестройкам на поведение хромосом в мейозе была выполнена на *C. talarum* (Basheva et al., 2014). Этот вид встречается вдоль побережья провинции Буэнос-Айрес в Аргентине (рис. 3, 24) и также характеризуется изменчивостью кариотипа за счет серии робертсоновских и полно-плечевых транслокаций (Reig, Kiblsky, 1969; Massarini et al., 1991, 2002; Ortells, 1995). В отличие от видов и популяций группы *C. perrensi*, упомянутых выше, поток генов между некоторыми популяциями *C. talarum*, по-видимому, ограничен, о чем свидетельствует анализ молекулярных маркеров (Mora et al., 2013).

Е.А. Башева и коллеги (Basheva et al., 2014) исследовали синапсис, рекомбинацию и мейотическую инактивацию транскрипции хромосом в мужском мейозе у простых и сложных гетерозигот по робертсоновским и полно-плечевым реципрокным транслокациям, выделенных из трех природных популяций *C. talarum* с использованием иммунолокализации белков боковых элементов синаптонемного комплекса (SYCP3), зрелых рекомбинационных узлов (MLH1) и фосфорилированного гистона (γ H2A.X) (рис. 4).

В большинстве клеток у структурных гетерозигот *C. talarum* исследователи наблюдали асинапсис вокруг точек разрыва перестроек. Аналогичное нарушение обнаружено у *C. perrensi*, гетерозиготных по нескольким робертсоновским транслокациям. Хотя частота клеток с асинапсисом имела тенденцию к снижению по мере прогрессии пахитены, даже на ее поздних стадиях более половины сперматоцитов с квадрилвалентами имели неспаренные районы. Однако относительный размер неспаренных районов синаптонемного комплекса был небольшим. Асинапсис был ограничен короткими плечами акроцентриков и прицентромерными районами метацентриков.

Фосфорилированный γ H2A.X почти полностью исчезал из районов асиаписиса к концу пахитены.

Обширный асиаписис в пахитене может вызвать мейотический сайленсинг неспаренного хроматина и привести к остановке мейоза из-за подавления транскрипции важнейших мейотических генов (Baarends et al., 2005; Turner et al., 2009; Manterola et al., 2009; Page et al., 2012) показали, что контрольные механизмы (checkpoint) пахитены могут игнорировать ограниченную степень асиаписиса. Мы полагаем, что незначительный и преходящий асиаписис в прицентромерных регионах мультивалентов у структурных гетерозигот *C. talarum* (Basheva et al., 2014) и *C. perrensi* (Lanzone et al., 2007) вряд ли может вызвать гибель зародышевых клеток и уменьшить плодовитость гетерозигот.

Иммунолокализация белка MLH1 позволила Е.А. Башевой с коллегами (Basheva et al., 2014) визуализировать сайты рекомбинации (рис. 5). Используя этот подход, исследователи обнаружили достоверное снижение частоты рекомбинации в прицентромерных областях три- и мультивалентов. Они также наблюдали тенденцию к снижению количества кроссоверов на плечо от акроцентрических гомозигот к гетерозиготам и метацентрическим гомозиготам и дистализацию распределения кроссоверов у гетерозигот и метацентрических гомозигот по сравнению с акроцентрическими гомозиготами (Basheva et al., 2014).

Эти эффекты могут играть существенную роль в ограничении потока генов через гибридные зоны между разными хромосомными расами *C. talarum* двумя различными способами. С одной стороны, подавление рекомбинации вокруг центромеры может консервировать неравновесие по сцеплению между аллелями, расположенными в перицентромерной области, и способствовать дальнейшей дивергенции генетического содержания родительских хромосом. С другой стороны, уменьшение количества кроссоверов в определенных плечах мультивалентов может увеличить частоту нерасхождения хромосом в метафазе I мейоза, которая и так высока у сложных гетерозигот с монобрахимальной гомологией. Это, в свою очередь, может снизить плодовитость хромосомных гетерозигот и ограничить поток генов между кариотипически различными популяциями.

Заклучение

Виды и локальные популяции туко-туко представляют собой крайне интересную модель для исследования процесса видообразования и его механизмов. Сочетание экологических, молекулярно-генетических и цитогенетических подходов позволило выявить генетическую подразделенность локальных популяций, часто не совпадающую ни с видовыми границами, ни с границами хромосомных рас. До сих пор не обнаружено существенных эффектов хромосомных перестроек на фертильность их гетерозиготных носителей. Это ставит под сомнение валидность гипотезы хромосомного видообразования в ее классической форме для объяснения высоких скоростей видообразования в роде *Ctenomys*. Высокая частота фиксации различных хромосомных перестроек в локальных популяциях

туко-туко обусловлена очень низкой эффективной численностью демов и редкостью миграции. Исследования поведения хромосом в мейозе у структурных гетерозигот показывают, что альтернативная фиксация хромосомных перестроек может локально менять частоту и распределение рекомбинационных событий по геному. Таким образом, хромосомные перестройки не могут выступать в роли пускового механизма видообразования у туко-туко, но могут ускорять этот процесс, модулируя интенсивность потока генов в определенных районах генома.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным финансированием по государственному заданию (проект № 0324-2015-0003), а также грантами РФФИ № 13-04-90906, 15-04-08389, 16-04-00087. Авторы выражают признательность ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН за доступ к микроскопической технике.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Argüelles C.F., Suárez P., Giménez M.D., Bidau C.J. Intraspecific chromosome variation between different populations of *Ctenomys dorbignyi* (Rodentia, Ctenomyidae) from Argentina. *Acta Theriolog.* 2001;46:363-373.
- Axenovich T.I., Rogatcheva M.B., Oda S.-I., Borodin P.M. Inheritance of male hybrid sterility in the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). *Genome.* 1998;41:825-831.
- Baarends W.M., Wassenaar E., van der Laan R., Hoogerbrugge J., Sleddens-Linkels E., Hoeijmakers J.H., de Boer P., Grootegoed J.A. Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25:1041-1053.
- Basheva E.A., Torgasheva A.A., Gomez Fernandez M.J., Boston E., Mirol P., Borodin P.M. Chromosome synapsis and recombination in simple and complex chromosomal heterozygotes of tuco-tuco (*Ctenomys talarum*: Rodentia: Ctenomyidae). *Chromosome Res.* 2014; 22:351-363.
- Bhattacharyya T., Gregorova S., Mihola O., Anger M., Sebestova J., Denny P., Simecek P., Forejt J. Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *PNAS.* 2013;110:E468-E477.
- Bidau C.J., Gimenez M.D., Palmer C.L., Searle J.B. The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity (Edinb.).* 2001;87:305-313.
- Borodin P., Barreiros-Gomez S., Zhelezova A., Bonvicino C., D'Andrea P. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Genome.* 2006;49:159-167.
- Borodin P.M., Karamysheva T.V., Belonogova N.M., Torgasheva A.A., Rubtsov N.B., Searle J.B. Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia). *Genetics.* 2008;178: 621-632.
- Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10: 207-216.
- Busch C., Antinuchi C.D., del Valle J.C., Kittlein M., Malizia A.I., Vassallo A.I., Zenuto R.R. Population ecology of subterranean rodents. In: Lacey E., Cameron G., Patton J., eds. *Life underground: the biology of subterranean rodents.* Chicago, Illinois: UCP, 2000;183-226.
- Capanna E., Castiglia R. Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogen. Gen. Res.* 2004;105:375-384.

- Caraballo D.A., Abruzzese G.A., Rossi M.S. Diversity of tuco-tucos (*Ctenomys*, Rodentia) in the Northeastern wetlands from Argentina: mitochondrial phylogeny and chromosomal evolution. *Genetica*. 2012;140:125-136.
- Castiglia R. Sympatric sister species in rodents are more chromosomally differentiated than allopatric ones: implications for the role of chromosomal rearrangements in speciation. *Mammal Rev.* 2014; 44:1-4.
- Castiglia R., Capanna E. Contact zones between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 1. Temporal analysis of a hybrid zone between the CD chromosomal race ($2n = 22$) and populations with the standard karyotype. *Heredity*. 1999;83:319-326.
- Castiglia R., Capanna E. Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in laboratory-reared and wild mice heterozygous for multiple Robertsonian rearrangements. *Heredity*. 2000;85:147-156.
- Castilho C.S., Gava A., Freitas T.R.O. Hybrid zone in genus *Ctenomys*: a study case in southern Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 2012;35:990-997.
- Castillo A.H., Cortinas M.N., Lessa E.P. Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *J. Mammal.* 2005; 86:170-179.
- Cook J.A., Anderson S., Yates T.L. Notes on Bolivian Mammals 6: The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands. *Am. Mus. Novit.* 1990;2980:1-27.
- Dumas D., Britton-Davidian J. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and robertsonian populations of the house mouse. *Genetics*. 2002;162:1355-1366.
- Dumas D., Catalan J., Britton-Davidian J. Reduced recombination patterns in Robertsonian hybrids between chromosomal races of the house mouse: chiasma analyses. *Heredity*. 2015;114:56-64.
- Faria R., Navarro A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol. Evol.* 2010;25:660-669.
- Feito R., Gallardo M. Sperm morphology of the Chilean species of *Ctenomys* (Octodontidae). *J. Mammal.* 1982;63:658-661.
- Fernández M.J.G., Gaggiotti O.E., Mirol P. The evolution of a highly speciose group in a changing environment: are we witnessing speciation in the Iberá wetlands? *Mol. Ecology*. 2012;21:3266-3282.
- Freitas D.T. Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogen. Gen. Res.* 1994;67: 193-198.
- Freitas T.R. Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae). *Brazilian J. Genetics*. 1997;20:1-7.
- Freitas T.R. *Ctenomys* lami: The highest chromosome variability in *Ctenomys* [Rodentia, Ctenomyidae] due to a centric fusion-fission and pericentric inversion system. *Acta Theriolog.* 2007;52:171-180.
- Freygang C.C., Marinho J.R., Freitas T.R.O. New karyotypes and some considerations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica*. 2004;121:125-132.
- Gallardo M. Las especies chilenas de *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). I. Estabilidad cariotípica. *Archivos Biología Medicina experimental.* 1979;12:71-82.
- Gallardo M.H. Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *J. Mammal.* 1991;72:11-21.
- Gava A., Freitas T.R.O. Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia; Ctenomyidae). *J. Mammal.* 2002;83:843-851.
- Gava A., Freitas T.R.O. Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica*. 2003;119:11-17.
- Giménez M., Mirol P., Bidau C., Searle J. Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. *Cytogen. Gen. Res.* 2002;96:130-136.
- Jackson B.C. Recombination-suppression: how many mechanisms for chromosomal speciation? *Genetica*. 2011;139:393-402.
- Kiblicky P., Brum-Zorrilla N., Perez G., Saez F. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana*. 1977;2: 85-93.
- King M. Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity* (Edinb.). 1987;59(1):1-6.
- King M. Species evolution: the role of chromosome change. CUP, 1995.
- Lacey E.A., Braude S.H., Wieczorek J.R. Burrow sharing by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*). *J. Mammal.* 1997;78:556-562.
- Lacey E.A., Wieczorek J.R. Kinship in colonial tuco-tucos: evidence from group composition and population structure. *Behavioral Ecol.* 2004;15:988-996.
- Lanzone C., Gimenez M., Santos J., Bidau C. Meiotic effects of Robertsonian translocations in tuco-tucos of the *Ctenomys perrensi* superspecies (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia*. 2007;60:233-244.
- Lessa E.P. The evolution of subterranean rodents: a synthesis. In: Lacey E., Patton J., Cameron G., eds. *Life underground: the biology of subterranean rodents*, Chicago, Illinois: UCP, 2000;389-420.
- Lessa E.P., Cook J.A. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Mol. Phylogen. Evol.* 1998;9:88-99.
- Livingstone K., Rieseberg L. Chromosomal evolution and speciation: a recombination-based approach. *New Phytologist*. 2004;161: 107-112.
- Lopes C., Ximenes S., Gava A., de Freitas T. The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity*. 2013;111:293-305.
- Manterola M., Page J., Vasco C., Berrios S., Parra M.T., Viera A., Rufas J.S., Zuccotti M., Garagna S., Fernandez-Donoso R. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Gen.* 2009;5:e1000625.
- Mascheretti S., Mirol P.M., Giménez M.D., Bidau C.J., Contreras J.R., Searle J.B. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biol. J. Linnean Society*. 2000;70:361-376.
- Massarini A., Barros M., Ortells M., Reig O. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica*. 1991;83:131-144.
- Massarini A.I., Freitas T.R.O. Morphological and cytogenetics comparison in species of the mendocinus-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia-Ctenomyidae). *Caryologia*. 2005;58:21-27.
- Massarini A., Mizrahi D., Tiranti S., Toloza A., Luna F., Schleich C. Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum talarum* from the Atlantic coast of Buenos Aires Province, Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Mastozool. Neotrop.* 2002;9:199-207.
- Mercer S.J., Wallace B.M., Searle J.B. Male common shrews (*Sorex araneus*) with long meiotic chain configurations can be fertile: implications for chromosomal models of speciation. *Cytogen. Cell Genet.* 1992;60:68-73.
- Merico V., Gimenez M.D., Vasco C., Zuccotti M., Searle J.B., Hauffe H.C., Garagna S. Chromosomal speciation in mice: a cytogenetic analysis of recombination. *Chromosome Res.* 2013;21:523-533.
- Mirol P., Gimenez M.D., Searle J.B., Bidau C.J., Faulkes C.G. Population and species boundaries in the South American subterranean rodent *Ctenomys* in a dynamic environment. *Biol. J. Linnean Society*. 2010;100:368-383.
- Mora M.S., Lessa E.P., Kittlein M.J., Vassallo A.I. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Rodentia: Ctenomyidae) in sand-dune habitats: evidence of recent population expansion. *J. Mammal.* 2006;87:1192-1203.
- Mora M.S., Cutrera A.P., Lessa E.P., Vassallo A.I., D'Anatro A., Mapelli F.J. Phylogeography and population genetic structure of the Talas

- tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): integrating demographic and habitat histories. *J. Mammal.* 2013;94:459-476.
- Novello A., Villar S. Chromosome plasticity in *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae): chromosome 1 evolution and heterochromatin variation. *Genetica.* 2006;127:303-309.
- Ortells M.O. Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biol. J. Linnean Society.* 1995;54:43-70.
- Ortells M., Contreras J., Reig O. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica.* 1990;82:189-201.
- Page J., de la Fuente R., Manterola M., Parra M.T., Viera A., Berrios S., Fernandez-Donoso R., Rufas J.S. Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma.* 2012;121:307-326.
- Parada A., D'Elia G., Bidau C.J., Lessa E.P. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J. Mammal.* 2011;92:671-682.
- Pearson O.P., Christie M.I. Los tuco-tucos (genero *Ctenomys*) de los parques nacionales Lanin y Nahuel Huapi, Argentina. *Historia Natural.* 1985;5:337-343.
- Reguero M., Candela A., Alonso R. Biochronology and biostratigraphy of the Uquia Formation (Pliocene-early Pleistocene, NW Argentina) and its significance in the Great American Biotic Interchange. *J. South Am. Earth Sciences.* 2007;23:1-16.
- Reig O.A., Kiblicky P. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). A progress report. *Chromosoma.* 1969;28:211-244.
- Reig O., Busch C., Contreras J., Ortells M. An overview of evolution, systematic, population biology and molecular biology. In: Nevo E., Reig O.A., eds. *Biology of subterranean mammals.* New York: Wiley-Liss, 1990;71-96.
- Reig O., Massarini A., Ortells M., Barros M., Tiranti S., Dyzenchou F. New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia.* 1992;56:603-624.
- Rieseberg L.H. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 2001;16:351-358.
- Rogatcheva M.B., Oda S.-I., Axenovich T.I., Aulchenko Y.S., Searle J.B., Borodin P.M. Chromosomal segregation and fertility in Robertsonian chromosomal heterozygotes of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). *Heredity.* 1998;81:335-341.
- Sage R., Contreras J., Roig V., Patton J. Genetic variation in the South American burrowing rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Zeitschrift Säugetierkunde.* 1986;51:158-172.
- Searle J. Meiotic studies of Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus* L. *Cytogen. Gen. Res.* 1986;41:154-162.
- Searle J.B. Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process.* Ed. R.G. Harrison. New York: Oxford Univ. Press, 1993;309-353.
- Slamovits C.H., Cook J.A., Lessa E.P., Rossi M.S. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Mol. Biol. Evol.* 2001;18:1708-1719.
- Tomasco I., Lessa E., Kelt D., Lessa E., Salazar-Bravo J., Patton J. Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson.* Berkeley, CA: UCP Zool. Series. 2007;134:859-882.
- Turner J.M., Mahadevaiah S.K., Fernandez-Capetillo O., Nussenzweig A., Xu X., Deng C.X. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.* 2005;37:41-47.
- Verzi D.H. The dental evidence on the differentiation of the ctenomyine rodents (Caviomorpha, Octodontidae, Ctenomyiinae). *Acta Theriol.* 1999;44:263-282.
- Verzi D.H. Patrones de evolución morfológica en Ctenomyiinae (Rodentia, Octodontidae). *Mastozool. Neotropical.* 2002;9:309-328.
- Verzi D. Phylogeny and adaptive diversity of rodents of the family Ctenomyidae (Caviomorpha): delimiting lineages and genera in the fossil record. *J. Zoology.* 2008;274:386-394.
- Verzi D.H., Olivares A.I., Morgan C.C. The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, northwestern Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammalian Biol. Zeitschrift Säugetierkunde.* 2010;75:243-252.
- Wallace B., Searle J., Everett C. Male meiosis and gametogenesis in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) from a chromosomal hybrid zone; a comparison between "simple" Robertsonian heterozygotes and homozygotes. *Cytogen. Gen. Res.* 1992;61:211-220.
- White M.J.D. Models of speciation. New concepts suggest that the classical sympatric and allopatric models are not the only alternatives. *Science.* 1968;159:1065.
- White M.J.D. Chromosomal rearrangements and speciation in animals. *Ann. Rev. Genet.* 1969;3:75.
- White M.J.D. *Animal cytology and evolution.* CUP, 1977.
- White M.J.D. *Modes of speciation.* San Francisco, 1978.
- Wilson D.E., Reeder D.M. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference.* Johns Hopkins UP, 2005.
- Wlasiuk G.J., Garza C., Lessa E.P. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution.* 2003;57:913-926.
- Woods C., Kilpatrick C. *Infraorder Hystricognathi* Brandt, 1855. *Mammal Species of the World: A Taxon. Geographic Ref.* 2005;2:1538-1600.

Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления

Л.А. Першина^{1, 2}✉, Н.В. Трубачеева¹

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

Отдаленная гибридизация вносит существенный вклад в видообразование покрытосеменных растений, обеспечивая перенос генов между видами и расширяя их потенциал к адаптации. В экспериментальных условиях отдаленная гибридизация используется для увеличения генетического разнообразия культурных растений. В процессе видообразования определяющее значение имеет возникновение репродуктивной изоляции, а выявляемая у растений способность к отдаленным скрещиваниям определяется возможностью ее преодоления. В обзоре рассматриваются основные типы несовместимости при отдаленных скрещиваниях растений, а также факторы и методические подходы, способствующие преодолению репродуктивных барьеров. Пример генетического контроля презиготических барьеров – роль генов *Kr*, определяющих нескрещиваемость между пшеницей и рожью. Постзиготическая несовместимость может быть связана с сильно выраженной генетической и эпигенетической изменчивостью, индуцируемой в результате отдаленных скрещиваний. Ранние этапы постзиготического периода являются критическими для развивающихся гибридных семян из-за гибели зародышей, в том числе связанной с однородительской элиминацией хромосом из гибридных клеток и аномальным развитием эндосперма. Рассматриваются возможности использования методов культивирования *in vitro* для преодоления презиготической и эмбриональной несовместимости у гибридов. Подчеркивается, что депрессия и летальность гибридов F_1 обусловлены результатом взаимодействия комплементарных генов, вызывающих гибридные некроз, хлороз и карликовость. Обращено внимание на причины стерильности гибридов F_1 . В качестве одного из механизмов несовместимости при отдаленных скрещиваниях рассматриваются ядерно-цитоплазматические взаимодействия. Подчеркиваются проблемы в работе с реципрокными гибридами и аллоплазматическими линиями – основными моделями, используемыми при изучении эффектов цитоплазмы и ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Приведены примеры, указывающие на то, что аллоплазматические линии не являются результатом простого сочетания ядерного генома одного вида, а цитоплазмы – другого. Процесс формирования аллоплазматических линий связан со структурно-функциональной изменчивостью ядерных и оргanelльных геномов.

Ключевые слова: отдаленная гибридизация; покрытосеменные растения; межвидовая несовместимость; преодоление несовместимости.

Interspecific incompatibility in wide hybridization of plants and ways to overcome

L.A. Pershina^{1, 2}✉, N.V. Trubacheeva¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Wide hybridization is an important factor of angiosperm speciation and provides an introgression of genes between species. In experimental conditions wide hybridization is used to increase the genetic diversity of cultivated plants. Since the emergence of reproductive barriers is of great importance for speciation, plant capacity for wide crosses is determined by a possibility of overcoming these barriers. The review discusses the main types of incompatibility in wide crossing plants, as well as factors and methodological approaches that contribute to overcoming them. The role of *Kr* genes, which determine incompatibility between wheat and rye, is one of the examples of prezygotic isolation mechanism. Postzygotic incompatibility may be associated with a highly pronounced genetic and epigenetic variability induced by wide crossings. Early stages of the postzygotic period are crucial for developing hybrid seeds due to embryo's death, including those associated with uniparental chromosome elimination in hybrid cells and abnormal development of the endosperm. A depression and a lethality of F_1 hybrids may be the result of interaction between complementary genes, which cause hybrid necrosis, hybrid chlorosis, and hybrid dwarfness. The causes of hybrid sterility are discussed. Nuclear-cytoplasmic interactions are regarded as one of the mechanisms of incompatibility in wide crosses. Reciprocal hybrids and alloplasmic lines are the main models for studying cytoplasm effects and nuclear-cytoplasmic interactions. Problems concerning work with their models are emphasized. There are some examples underlining the fact that alloplasmic lines are not a plain combination of nuclear genome and cytoplasm of different species. Development

of alloplasmatic lines is connected with structural and functional variability of nuclear and organelle genomes.

Key words: wide hybridization; angiosperm plants; interspecific incompatibility; overcoming incompatibility.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Першина Л.А., Трубачеева Н.В. Межвидовая несовместимость при отдаленной гибридизации растений и возможности ее преодоления. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):416-425. DOI 10.18699/VJ16.082

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Pershina L.A., Trubacheeva N.V. Interspecific incompatibility in wide hybridization of plants and ways to overcome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):416-425. DOI 10.18699/VJ16.082

Отдаленная гибридизация – распространенное явление в природных популяциях, что подтверждает существование гибридных зон в ареалах произрастания как покрытосеменных травянистых и древесных, так и голосеменных растений (Коропачинский, Милютин, 2006; Mahé et al., 2007; Moreno et al., 2015).

Благодаря высокой степени генетической изменчивости, к которой приводят отдаленные скрещивания, и возможности структурно-функциональной стабилизации гибридных геномов, отдаленная гибридизация вносит существенный вклад в видообразование, особенно покрытосеменных растений (Rieseberg, Wills, 2007). Рассматривают два пути видообразования с участием отдаленных гибридов: гомоплоидное (рекомбинантное) и полиплоидное. Гомоплоидное гибридное видообразование – формирование новых видов без изменения числа хромосом относительно исходных гибридов (Lai et al., 2005; Rieseberg, Wills, 2007). Гибридное полиплоидное видообразование включает полную дубликацию гибридного генома (аллополиплоидизацию) (Pires et al., 2004).

Отдаленная гибридизация не только способствует образованию новых видов, но и обеспечивает перенос генов между видами (Anderson, 1953; Rieseberg, Wendel, 1993). Это приводит к изменчивости в структуре популяций и расширяет потенциал видов к адаптации в меняющихся условиях произрастания (Seehausen, 2004).

В экспериментальных условиях получение отдаленных гибридов и аллополиплоидов используют для моделирования начальных этапов гибридного видообразования (Eilam et al., 2008), а также для увеличения генетического разнообразия культурных растений в результате создания синтетических аллополиплоидов (Alvarez et al., 1992) или интрогрессии новых генов в геном культурных видов от их дикорастущих и культурных сородичей (Tu et al., 2009; Ito et al., 2011; Лайкова и др., 2013; Першина, 2014).

В процессе видообразования растений, так же, как и животных, определяющее значение имеет возникновение барьеров репродуктивной изоляции между видами (Sobel et al., 2010). Следовательно, способность покрытосеменных растений к отдаленным скрещиваниям определяется возможностью их преодоления. Механизмам репродуктивной изоляции с точки зрения их роли в эволюции уделяется большое внимание (Rieseberg, Carney, 1998; Widmer et al., 2009; Sobel et al., 2010). Не менее важной является и необходимость их изучения с целью разработки методов преодоления несовместимости при отдаленных скрещиваниях. Работы в этом направлении были заложены

в первой половине прошлого века (Карпеченко, 1935) и интенсивно развиваются до настоящего времени (Kruse, 1974; Van Tuyl et al., 1991; Pershina et al., 1998; Першина и др., 2012; Першина, 2014; Niu et al., 2014).

В обзоре рассматриваются основные типы несовместимости, проявляющиеся при отдаленных скрещиваниях и развитии гибридных растений, а также факторы и методические подходы, которые способствуют преодолению межвидовой несовместимости и получению новых генотипов растений на основе отдаленной гибридизации.

Типы несовместимости при отдаленных скрещиваниях. Презиготическая несовместимость

Несовместимость, проявляющаяся до оплодотворения, определяют как презиготическую (неспособность к скрещиванию), после оплодотворения – как постзиготическую (скрещивание происходит, но не развиваются гибридные семена; наблюдаются слабое развитие, нежизнеспособность или стерильность гибридов F_1 , а также гибридов более поздних поколений) (Rieseberg, Carney, 1998; Widmer et al., 2009). Помимо генетически обусловленных презиготических барьеров (например, различий во времени цветения растений), скрещиваемости могут препятствовать экологические факторы (в том числе разобщенность мест обитания) (Rieseberg, Carney, 1998). В случае если популяции разных видов после периода географической изоляции оказываются в одном ареале, например в результате их интродукции из естественных мест обитания, могут произойти скрещивания между ними с последующим образованием гибридных зон, а затем и новых видов. В этом отношении наиболее хорошо изучены гибридные зоны, связанные с недавними событиями видообразования: кордовой травы – аллополиплоидного вида *Spartina anglica* ($2n = 124$) на юге Великобритании (Ainouche et al., 2004); видов крестовника – рекомбинантного тетраплоида *Senecio eboracensis* ($2n = 40$) и аллотетраплоида *S. cambrensis* ($2n = 60$) в центре Великобритании и в Ирландии (Abbott et al., 2005); тетраплоидных видов козлобородника *Tragopogon miscellus* ($2n = 24$) и *T. mirus* ($2n = 24$) в Северной Америке (Tate et al., 2006).

Генетически детерминированные презиготические типы репродуктивной изоляции проявляются в виде прогамной несовместимости (при прорастании пыльцы и пыльцевых трубок) и сингамной несовместимости (во время двойного оплодотворения) (Шульдин, 1978). Так, причиной нескрещиваемости генотипов мягкой пшени-

цы *Triticum aestivum*, носителей доминантных генов *Kr* (crossability with rye), с рожью посевной *Secale cereale* является неспособность пыльцевых трубок проникнуть в зародышевый мешок (Lange, Wojciechowska, 1976). У мягкой пшеницы обнаружено пять генов, ответственных за проявление этого признака: *Kr1*, *Kr2*, *Kr3*, *Kr4* и *Skr*, соответственно локализованных на хромосомах 5B, 5AL, 5D, 1A и 5BS (Bertin et al., 2009).

Интрогрессия рецессивных аллелей *kr1* от доноров этих аллелей в другие генотипы пшеницы может приводить к повышению скрещиваемости этих генотипов не только с рожью (Molnár-Láng et al., 1996), но и с ячменем *Hordeum vulgare*, что важно для получения пшенично-ячменных гибридов и генотипов мягкой пшеницы с интрогрессией хромосом ячменя (Molnár-Láng et al., 2000). Однако выявлены гибридные комбинации, в том числе мягкая пшеница × культурный ячмень (Koba et al., 1992), мягкая пшеница × кукуруза (Laurie, Bennett, 1987), в которых гены *Kr* не проявили действия. По-видимому, в семействе злаковых генетический контроль скрещиваемости между видами определяется более сложными механизмами.

В случаях, если у гибридных комбинаций пыльцевые трубки дорастают до завязи и входят в зародышевый мешок, нарушения могут проявляться во время оплодотворения: спермии не сливаются ни с ядром яйцеклетки, ни с центральной клеткой или объединяются только с ядром яйцеклетки или только с ядром центральной клетки (Банникова, 1986).

Среди факторов внешней среды на скрещиваемость влияние оказывают температура и интенсивность освещения (Bertin et al., 2009). Для преодоления несовместимости, связанной с нарушениями прорастания пыльцевых трубок и оплодотворения, у ряда двудольных растений используют опыление *in vitro* в сочетании с методами культивирования завязей, семяпочек и изолированных зародышей (Van Tuyl et al., 1991). Для стимулирования прорастания пыльцевых трубок, оплодотворения и развития гибридных зародышей цветки материнских растений как двудольных (Zhou et al., 1991; Jansky, 2006), так и однодольных растений (Kruse, 1974; Pershina et al., 1998; Першина и др., 2000; Sanei et al., 2011; Niu et al., 2014) до опыления или после обрабатывают фитогормонами. Это позволяет не только осуществлять межвидовые скрещивания, например, в родах *Nicotiana* (Zhou et al., 1991), *Solanum* (Jansky, 2006), *Hordeum* (Sanei et al., 2011), но и производить скрещивания между видами, которые отнесены к разным подтрибам: *H. vulgare* × *T. aestivum* (Kruse, 1974; Pershina et al., 1998), *H. geniculatum* (= *H. marinum* ssp. *gussoneanum*) ($2n = 28$) × *T. aestivum* (Pershina et al., 1988) и разным трибам: *T. aestivum* × *Zea mays* (Niu et al., 2014), *T. aestivum* × *Pennisetum glaucum* (Inagaki, Mujeeb-Kazi, 1998).

Изменчивость гибридных геномов и постзиготическая несовместимость

В тех случаях, когда при отдаленных скрещиваниях происходит оплодотворение и образуются гибридные клетки, их деление может быть нарушено в разные периоды развития гибридных организмов, начиная от деления зиготы до формирования репродуктивных органов гибридов F_1 или их потомков. Одна из причин этих нарушений

обусловлена тем, что отдаленная гибридизация (как и аллополиплоидизация) вызывает «геномный шок», приводящий к быстрым генетическим и эпигенетическим изменениям во вновь сформированном геноме у гибридов и их потомков (Ainouche et al., 2004; Ng et al., 2012; Wang et al., 2014): в результате элиминации кодирующих и не кодирующих последовательностей ДНК уменьшается размер генома и происходит потеря генов (Eilam et al., 2008), активируются мобильные элементы, что приводит к хромосомным перестройкам (Comai, 2000), вследствие «транскриптомного шока» изменяется экспрессия генов (Gaeta et al., 2009; Buggs et al., 2011).

Преобразования гибридных геномов, в зависимости от происхождения исходных гибридных комбинаций, могут приводить к различным результатам. В одних случаях гибриды не развиваются, в других среди потомков гибридов, в том числе после дубликации геномов, формируются стабильные линии. Некоторые из них могут стать репродуктивно изолированными видами и, характеризуясь признаками гетерозиса, превосходить родительские виды по плодовитости, жизнеспособности и адаптивности (Ellstrand, Schierenbeck, 2000; Ainouche et al., 2004).

Эмбриональная несовместимость и возможности ее преодоления

Ранние этапы постзиготического периода являются критическими для развивающихся гибридных семян. После двойного оплодотворения несовместимость может проявляться начиная с первого деления зиготы в течение всего периода развития зародыша (эмбриональная несовместимость) и приводит к выраженным нарушениям в развитии эндосперма (Банникова, 1986; Vinkenoog et al., 2003). Для преодоления эмбриональной несовместимости применим метод «спасения зародышей» (embryo rescue techniques), предусматривающий их своевременное вычленение и культивирование *in vitro*. Сроки и способы вычленения гибридных зародышей, состав питательных сред и условия культивирования зависят от таксономической принадлежности скрещиваемых видов (Kruse, 1974; Pershina et al., 1998; Yang et al., 2007). Впервые этот метод был использован для культивирования гибридных зародышей льна (Laibach, 1925) и применяется для получения гибридов F_1 многих культур, в том числе злаковых (Kruse, 1974; Pershina et al., 1998; Moreno et al., 2014), овощных (Geerts et al., 2011), цитрусовых (Aleza et al., 2012), винограда (Li et al., 2014a) и др.

Крайнее проявление несовместимости между чужеродными геномами – полная или частичная элиминация хромосом одного из родителей из гибридных клеток зародыша, что, по сути, – избавление от чужеродной ДНК путем ее уничтожения (Houben et al., 2011). Это явление было описано еще в 20-е годы прошлого столетия (Карпеченко, 1935). Однородительская элиминация хромосом характерна для многих гибридных комбинаций ячменя (Subrahmanyam, Bothmer, 1987; Pershina, Shumny, 2000), ряда гибридов пшеницы, овса, табака, томатов, капустных (Houben et al., 2011). При полной элиминации генома одного родительского вида развиваются гаплоидные зародыши другого (Subrahmanyam, Bothmer, 1987; Ishii et al., 2010), а при частичной – к гаплоидному набору одного

родительского вида добавлены отдельные хромосомы другого (Riera-Lizarazu et al., 1996).

Механизмы однородительской элиминации наиболее хорошо изучены на примере межвидовой гибридной комбинации *H. vulgare* × *H. bulbosum* (Gernand et al., 2006; Sanei et al., 2011) и межтрибной – *T. aestivum* × *P. glaucum* (Gernand et al., 2005; Ishii et al., 2010). Процесс элиминации хромосом сопровождается следующие события: пространственное разделение родительских геномов в интерфазном ядре; нарушение расхождения сестринских хроматид вида-гаплопродюсера в анафазе; образование хромосомных перестроек и микроядер; гетерохроматизация и фрагментация ДНК микроядер; разрушение микроядер под действием эндонуклеазы (Gernand et al., 2005, 2006; Ishii et al., 2010).

Основная причина элиминации хромосом *H. bulbosum* в комбинации *H. vulgare* × *H. bulbosum* связана с инактивацией их центромер. Это определяется тем, что неактивные центромеры *H. bulbosum*, в отличие от активных центромер *H. vulgare*, не содержат (или имеют в малом количестве) гистон СЕНН3, который является сайтом сборки для кинетохорного комплекса нормально функционирующей центромеры (Sanei et al., 2011). «Элиминационная сила» генома *H. vulgare* по отношению к геному *H. bulbosum* проявляется в комбинациях, в которых оба родителя имеют одинаковое число хромосом, – *H. vulgare* ($2n = 14$) × *H. bulbosum* ($2n = 14$) или *H. vulgare* ($2n = 28$) × *H. bulbosum* ($2n = 28$), т.е. при соотношении родительских геномов 1:1 (Davies, 1974; Pershina, Shumny, 2000). Гены, ответственные за процесс элиминации, локализованы в коротких плечах второй и третьей хромосом культурного ячменя (Ho, Kasha, 1975).

Гибридные комбинации с проявлением однородительской элиминации хромосом – *H. vulgare* × *H. bulbosum*, *T. aestivum* × *Z. mays*, *T. aestivum* × *P. glaucum* – используют в сочетании с методом культивирования зародышей для получения ДГ-линий (дигаплоидных линий, сформированных на основе гаплоидных растений с удвоенным числом хромосом) ячменя (Devaux, 2003) и пшеницы (Inagaki, Mujeeb-Kazi, 1998; Niroula, Bimb, 2009). В результате неполной элиминации хромосом кукурузы в гибридных комбинациях *Avena sativa* × *Z. mays* получен набор овсяно-кукурузных дополненных линий, использованный для картирования генома кукурузы (Ananiev et al., 1997). Процесс элиминации хромосом может регулироваться условиями выращивания растений в период развития гибридных зародышей или гибридных растений: повышение температуры до 30 °С ускоряет элиминацию хромосом (Pershina, Shumny, 2000; Sanei et al., 2011), при температуре ниже 18 °С этот процесс задерживается (Sanei et al., 2011).

Проявление несовместимости у гибридов F₁

С началом развития гибридов F₁ постзиготическая несовместимость может быть результатом проявления гибридного хлороза, гибридной карликовости или гибридного некроза, наблюдаемых у растений разных систематических групп и обусловленных комплементарным взаимодействием генов, носителями которых является

каждый из родительских видов (Lee, 1981; Tsunewaki, 1992; Пухальский и др., 2002).

Под действием генов, вызывающих гибридный хлороз, формируются аномальные, быстро деградирующие хлоропласты, что приводит к пожелтению листьев и преждевременному старению растений (Nakano et al., 2015). На примере пшенично-ржаных гибридов *T. aestivum* × *S. cereale* установлено, что в результате взаимодействия генов гибридной карликовости на ранних этапах развития побегов прекращается развитие апекса и таким образом блокируется переход от вегетативной стадии развития к генеративной (Tikhenko et al., 2015).

Гибридный некроз (или «гибридная слабость») может проявляться в разные фазы развития растений, а от степени их поражения – приводить к летальному, сублетальному или нормальному фенотипу (Пухальский и др., 2002). Крайняя степень гибридного некроза обусловлена запрограммированной гибелью клеток, приводящей к постепенному усыханию и отмиранию листьев от кончиков до их основания (Mizuno et al., 2010). Это становится причиной массовой гибели гибридных проростков от развития первых листьев до колошения, являясь, например, определяющим механизмом несовместимости между культурным ячменем *H. vulgare* и рожью посевной *S. cereale* (Першина и др., 2000). Гибридный некроз ассоциирует с целым комплексом фенотипических признаков, аналогичных тем, которые проявляются у растений в ответ на воздействие стрессов, включая поражение патогенами (Bombliys, Weigel, 2007). Обнаружены гибридные комбинации пшеницы (Sharma et al., 2003) и *Arabidopsis thaliana* (Bombliys et al., 2007), которые рассматривают в качестве моделей для изучения аутоиммунной системы у растений и молекулярных механизмов постзиготической несовместимости, обусловленной действием генов гибридного некроза.

Накопление данных о генетическом контроле гибридного хлороза, гибридной карликовости и гибридного некроза, а также их распространение у сортов и дикорастущих сородичей (Tsunewaki, 1992; Пухальский и др., 2008) способствуют целенаправленному подбору родительских пар для получения жизнеспособных гибридов как при межсортовых, так и при отдаленных скрещиваниях.

Другим широко распространенным постзиготическим барьером несовместимости является стерильность гибридов. Стерильность, обусловленная образованием нефункциональных гамет с несбалансированным числом хромосом, может быть следствием их аномального поведения в мейозе из-за хромосомной несовместимости, что описано для многих гибридных комбинаций (Вавилов, 1935; Будашкина, 1971; Нумерова и др., 1990; Moreno et al., 2014).

Классический подход к восстановлению фертильности гибридов F₁, особенно полученных от скрещиваний родительских видов с разным числом хромосом, – удвоение их числа, обеспечивающее формирование бивалентов между гомологичными хромосомами и правильное их расхождение (Feldman, Levy, 2005). К дубликации геномов приводят спонтанное или индуцированное удвоение числа хромосом в соматических клетках, например под действием колхицина (Blakeslee, Avery, 1937), и образо-

вание функциональных женских и мужских гамет с нередуцированным числом хромосом (Silkova et al., 2011; Crismani et al., 2013). Кроме генетической обусловленности образования функциональных гамет у отдаленных гибридов (Silkova et al., 2011), на этот процесс оказывают влияние экзогенные факторы – высокая температура (Карпеченко, 1938) или условия *in vitro* при наличии фитогормонов в культуральных средах, обеспечивающих регенерацию проростков в каллусной культуре, индуцированной из соматических клеток гибридов (Pershina et al., 1998). При сильно выраженных межгеномных конфликтах, приводящих к широкому спектру нарушений в мейозе, как, например, в комбинации *Oryza sativa* ($2n = 24$) × *Luziola peruviana* ($2n = 24$), индуцировать образование функциональных гамет не удается (Mogeno et al., 2014). Аномальное поведение хромосом в мейозе – не единственная причина образования нежизнеспособных гамет. Так, у некоторых комбинаций межподвидовых гибридов *O. sativa* subsp. *indica* × *O. sativa* subsp. *japonica* мейоз до образования тетрад протекает нормально, но после этой стадии происходят многочисленные нарушения в развитии микроспор и пыльников (Liu et al., 2004).

Кроме того, стерильность у отдаленных гибридов может проявляться и в результате ядерно-цитоплазматической несовместимости (Zhu et al., 2008).

Ядерно-цитоплазматические взаимодействия как один из механизмов несовместимости при отдаленных скрещиваниях и особенности моделей для их изучения

В растительной клетке наследуемая генетическая информация неравномерно распределена между геномами ядра, митохондрий и пластид. Структурно-функциональная коадаптация между этими геномами в процессе эволюции сопровождалась как интеграцией большей части генов пластид и митохондрий в ядерный геном, так и потерей генов органелл (Jesse et al., 2008). Ядерный геном контролирует экспрессию органелльных генов с помощью факторов, которые взаимодействуют на посттранскрипционном уровне с целевыми органелльными транскриптами. Этот процесс называется антероградной регуляцией (Brautigam et al., 2007). Со стороны органелльных геномов осуществляется ретроградная регуляция, включающая множество путей передачи сигналов, направленных на регулирование экспрессии ядерных генов (Fujii, Toriyama, 2008). Скоординированные взаимодействия между ядерным и органелльными геномами определяют как «ядерно-цитоплазматические взаимодействия» (Michalak de Jimenez et al., 2013). В случае нарушения взаимодействий между ядром и органелльными геномами возникают ядерно-цитоплазматические конфликты. Следствием такого конфликта является цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), ассоциированная с мутациями генов митохондриального генома, оказывающих влияние на целевые ядерные гены, ответственные за развитие органов цветка и пыльцы (Yang et al., 2008).

Более сложные механизмы межгеномных взаимодействий, в том числе связанных с нарушениями эволюционно сложившегося ядерно-цитоплазматического баланса, проявляются при отдаленной гибридизации. Это опре-

деляется тем, что у отдаленных гибридов в одном ядре объединяются два разных родительских генома, внедренных в большинстве случаев в материнскую цитоплазму. В литературе вполне справедливо подчеркивается, что роли ядерно-цитоплазматических взаимодействий в постзиготической изоляции между видами уделяется мало внимания, а в качестве моделей для изучения эффектов ядерно-цитоплазматических взаимодействий рассматриваются реципрокные гибриды и аллоплазматические линии (Levin, 2003).

Реципрокные гибриды сочетают один и тот же ядерный гибридный геном с разной цитоплазмой, поэтому при наличии различий между парами реципрокных гибридов их можно считать результатом влияния цитоплазмы или особенностей ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Так, влиянием цитоплазмы объясняют неодинаковый уровень метилирования ДНК и различия в паттернах экспрессии генов у реципрокных гибридов между сортом *Nipponbare Oryza sativa* ssp. *japonica* и линией 93-11 *O. sativa* ssp. *indica* (He et al., 2010), а также различия в проявлении фенотипических признаков (высоты растений, формы плода и массы одного плода) у реципрокных гибридов между *Solanum lycopersicum* и *S. pimpinellifolium*, которые определяются дифференциальной экспрессией генов, опосредованной влиянием некодирующих малых РНК (Li et al., 2014b).

Однако различия, проявляющиеся у реципрокных гибридов, могут не только быть связаны с влиянием цитоплазмы, но и определяться эффектами происхождения родителей (parent-of-origin effects), что оказывает существенное воздействие в период развития гибридных семян (Dilkes, Comai, 2004). В зависимости от плоидности скрещиваемых видов могут нарушаться необходимое соотношение (2:1) полного набора хромосом материнского генотипа к отцовскому (Bushell et al., 2003), а также баланс импринтированных генов в эндосперме (Vinkenoog et al., 2003). Это влечет за собой аномальное развитие эндосперма и функционально связанного с ним гибридного зародыша. Использование реципрокных гибридов в качестве моделей для изучения ядерно-цитоплазматических взаимодействий усложняется и тем, что не для всех гибридных комбинаций возможно осуществить оба направления скрещиваний из-за генетически детерминированной презиготической репродуктивной изоляции (Rieseberg, Carney, 1998).

Другими моделями для изучения роли ядерно-цитоплазматических взаимодействий в качестве постзиготических механизмов несовместимости являются аллоплазматические линии (Levin, 2003). По определению, аллоплазматические линии (ядерно-цитоплазматические гибриды) сочетают ядерный геном одного вида, а цитоплазму – другого (Kaul, 1988). Теоретически для образования аллоплазматических линий должны происходить два основных события: 1) замещение материнского ядерного генома на отцовский ядерный геном в процессе последовательных возвратных скрещиваний гибридов с отцовским видом; 2) эволюционно закрепленная передача органелльных геномов по материнской линии (Tsunewaki, 1996). Аллоплазматические линии получены у разных видов *Triticum* (Tsunewaki, 1996), *Allium cepa* (Vu et al., 2011), *Brassica*

napus (Landgren et al., 1996; Shinada et al., 2006), *Nicotiana tabacum* (Farbos et al., 2001) и других растений. В зависимости от ядерно-цитоплазматических комбинаций у аллоплазматических линий могут происходить нарушения клеточного развития, связанные с высокой частотой хромосомных аномалий в соматических клетках, приводящих к гибели клеток, подавлению роста и развития растений (Бадаева и др., 2006). Кроме того, у аллоплазматических линий отмечают задержку сроков созревания, проявление ЦМС, а также формирование беззародышевых или морщинистых семян, изменения в морфологии семядолей и листьев (Jiang et al., 1993; Suzuki et al., 1995), в структуре и окраске цветков (Farbos et al., 2001).

На примере аллоплазматических линий разного происхождения показана ассоциированность проявления ЦМС с функционированием митохондриальных генов (Landgren et al., 1996; Shinada et al., 2006). Поскольку аллоплазматические линии с ЦМС рассматривают как одну из систем, используемых для получения гибридных семян (Pelletier, Budar, 2007), важным аспектом служит выявление механизмов восстановления их фертильности.

Так, фертильность аллоплазматических линий восстанавливается в результате их опыления линиями, имеющими тот же ядерный геном, что и аллоплазматические линии, но которые несут ядерные гены – восстановители фертильности на чужеродной цитоплазме (Shinada et al., 2006). Например, у аллоплазматических линий мягкой пшеницы с цитоплазмой *Triticum timopheevii* восстановление фертильности (за счет развития жизнеспособной пыльцы) контролируется полигенной системой основных восьмидесяти ядерных *Rf1* – *Rf8* генов (*fertility restorer*), локализованных в хромосомах мягкой пшеницы 1A, 7D, 1B, 2DS, 6B, 6D, 7B, 6DS (Sinha et al., 2013), а также трех менее эффективных генов, локализованных в хромосомах 2A, 4B и 6A (Ahmed et al., 2001).

Кроме того, у генотипов пшеницы, имеющих чужеродную цитоплазму, происходит нарушение функционирования ядерных генов *scs* (*species cytoplasmic specific*), ответственных за ядерно-цитоплазматическую совместимость (Michalak de Jimenez et al., 2013). Гены *scs*, как и гены *Rf*, имеют специфические мишени в митохондриях, но, в отличие от генов *Rf*, не связаны с восстановлением фертильности у аллоплазматических линий, а определяют ядерно-цитоплазматическую совместимость за счет поддержания необходимого уровня энергии и жизнеспособности растений (Maan, 1992). Ядерно-цитоплазматическая совместимость у аллоплазматических линий пшеницы восстанавливается под действием генов *scs* (Hossain et al., 2004) или *Ncc* (*nuclear cytoplasmic compatibility*) (Asakura et al., 1997), которые интрогрессируются в ядерный геном аллоплазматических генотипов пшеницы в процессе их формирования из ядерного генома материнского вида (донора цитоплазмы).

Аналогичный механизм восстановления фертильности (за счет интрогрессии генов из ядерного генома донора цитоплазмы) характерен для аллоплазматических линий разного происхождения: *N. tabacum* с цитоплазмой *N. repanda* (Gerstel et al., 1978); *B. napus* с цитоплазмой *Enarthrocarpus lyratus* (Janeja et al., 2003); *B. juncea* с цитоплазмой *E. lyratus* (Banga et al., 2003), цитоплазмой

Erucastrum canariense (Prakash et al., 2001) и цитоплазмой *Diplotaxis catholica* (Pathania et al., 2003).

Степень выраженности ядерно-цитоплазматического конфликта зависит от филогенетической отдаленности видов, сочетающих чужеродные по отношению друг к другу ядерные геном и цитоплазму. Например, исследование аллоплазматических линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму видов *Aegilops* и дикорастущего вида ячменя *H. chilense*, показало, что более масштабные изменения на уровне транскрипции и метаболизма происходят у линий с цитоплазмой *H. chilense*, таксономически более отдаленного от пшеницы вида, чем виды *Aegilops* (Crosatti et al., 2013). Следует отметить, что в цитируемой работе изученные аллоплазматические линии, независимо от происхождения цитоплазмы, были фертильными.

Все рассмотренные выше примеры аллоплазматических линий предполагают, что у них сочетаются цитоплазма одного вида, а ядерный геном – другого, так как при их образовании происходила передача цитоплазмы по материнской линии. Между тем описаны случаи нарушения эволюционно закрепленного механизма наследования геномов органелл (Даниленко, Давыденко, 2003), в том числе при гибридизации (Даниленко, Давыденко, 2003; Bogdanova, 2007). Так, при межпопуляционных скрещиваниях *Helianthus verticillatus* выявлены случаи передачи хлоропластного генома (Ellis et al., 2008), а при межпопуляционных скрещиваниях *Silene vulgaris* – митохондриального генома (Bentley et al., 2010) от отцовского генотипа. При отдаленной гибридизации пшеницы отмечали замену передачи мтДНК по материнской линии на отцовское или двуродительское наследование (Soliman et al., 1987; Kiang et al., 1994; Kitagawa et al., 2002; Aksyonova et al., 2005).

Двуродительское наследование геномов органелл приводит к гетероплазмии у гибридов F_1 , т. е. к наличию в клетках гибридов более одного варианта митохондриальной (мт) или хлоропластной (хп) ДНК. При беккроссировании отцовским видом (пшеницей) ячменно-пшеничных гибридов *H. vulgare* × *T. aestivum*, для которых характерна гетероплазмия мтДНК, наблюдали изменчивость не только ядерного, но и митохондриального генома. При этом характер изменчивости мтДНК у формирующихся аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* ассоциирован или с восстановлением фертильности, или с закреплением стерильности (Аксьюнова et al., 2005; Трубочеева и др., 2009, 2012). Так, при восстановлении фертильности аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* происходит увеличение числа копий мтДНК пшеничного (отцовского) типа, а при закреплении стерильности преобладают копии материнского (ячменного) типа. Такую же закономерность наблюдали и при образовании аллоплазматических линий пшеницы, несущих цитоплазму определенных видов *Aegilops* (Tsukamoto et al., 2000; Hattori et al., 2002). Установлено, что дифференциальная амплификация копий мтДНК у аллоплазматических линий пшеницы находится под контролем ядерно-цитоплазматических взаимодействий и зависит от материнского вида – источника цитоплазмы (Hattori et al., 2002).

Состояние гетероплазмии отмечено у аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* и (*H. marinum* ssp.

gussoneanum)-*T. aestivum* и по определенным последовательностям хпДНК, что также можно объяснить дупликацией этих последовательностей при скрещиваниях видов ячменя *H. vulgare* и *H. marinum* ssp. *gussoneanum* с мягкой пшеницей (Трубочеева и др., 2012; Першина и др., 2014).

Таким образом, приведенные данные указывают на то, что аллоплазматические линии не являются результатом простого сочетания ядерного генома одного вида, а цитоплазмы – другого. В процессе становления аллоплазматических линий происходит ядерно-цитоплазматическая коадаптация, связанная со структурно-функциональной изменчивостью ядерного и оргanelльных геномов, которая может обеспечить восстановление фертильности и поддержание жизнеспособности этих линий.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту № 0324-2015-0005 и при поддержке РФФИ (№ 14-04-00574).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бадаева Е.Д., Першина Л.А., Бильданова Л.Л. Цитогенетическое исследование нестабильных по проявлению фертильности и жизнеспособности аллоплазматических рекомбинантных линий (*Hordeum vulgare*)-*Triticum aestivum*. Генетика. 2006;42(2): 198-209.

Банникова В.П. Межвидовая несовместимость у растений. Киев: Наук. думка, 1986.

Будашкина Е.Б. Цитогенетика межвидовых гибридов пшеницы. Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. Новосибирск: Наука, 1971:196-221.

Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. Л.: Сельхозгиз, 1935.

Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов оргanelл. Минск: Тэхналогія, 2003.

Карпеченко Г.Д. Теория отдаленной гибридизации. Теоретические основы селекции растений. Т. 1. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935.

Карпеченко Г.Д. Тетраплоидные ячмени, полученные действием высокой температуры. Биол. журнал. 1938;7(2).

Коропачинский И.Ю., Милютин Л.И. Естественная гибридизация древесных растений. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2006.

Лайкова Л.И., Белан И.А., Бадаева Е.Д., Россеева Л.П., Шепелев С.С., Шумный В.К., Першина Л.А. Создание и изучение сорта яровой мягкой пшеницы «Памяти Майстренко» с интрогрессией генетического материала от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegilops tauschii* Coss. Генетика. 2013;49(1):103-112.

Нумерова О.М., Першина Л.А., Шумный В.К. Особенности мейоза ячменно-пшеничных гибридов *H. vulgare* × *T. timopheevii* Zhuk. и их потомков от чужеродных скрещиваний. Цитология и генетика. 1990;24(3):22-26.

Першина Л.А. Хромосомная инженерия – направление биотехнологии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(1): 138-146.

Першина Л.А., Белова Л.И., Нумерова О.М., Шумный В.К. Особенности влияния генотипического разнообразия *Hordeum vulgare* L. и *Secale cereale* L. на скрещиваемость, развитие и жизнеспособность гибридных зародышей и растений. Генетика. 2000;36(4):520-526.

Першина Л.А., Девяткина Э.П., Трубочеева Н.В., Кравцова Л.А., Добровольская О.Б. Особенности восстановления фертильно-

сти аллоплазматических линий, полученных на основе гибридизации самоопыленного потомка ячменно-пшеничного амфиплоида (*Hordeum vulgare* L. × *Triticum aestivum* L.) с сортами мягкой пшеницы Саратовская 29 и Пиротрикс 28. Генетика. 2012;48(12):1372-1379.

Першина Л.А., Трубочеева Н.В., Синявская М.Г., Девяткина Э.П., Кравцова Л.А. Ядерно-цитоплазматическая совместимость и состояние районов митохондриальной и хлоропластной ДНК у аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий (*H. vulgare*) – *T. aestivum*. Генетика. 2014;50(10):1154-1162.

Пухальский В.А., Мартынов С.П., Добровольская Т.В. Гены гибридного некроза пшениц (теория вопроса и каталог носителей летальных генов). М.: Изд-во МСХА, 2002.

Пухальский В.А., Билинская Е.А., Мартынов С.П., Добровольская Т.В., Оболенкова Г.А. Новые данные по распространению генов гибридного некроза в сортах озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Генетика. 2008;44(2):209-218.

Трубочеева Н.В., Ефремова Т.Т., Бадаева Е.Д., Кравцова Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Першина Л.А. Получение аллоплазматических и эуплазматических пшенично-ячменных дителосомных замещенных линий 7Н1L^{mar}(7D) и изучение 18S/5S митохондриального повтора у этих линий. Генетика. 2009; 45(12):1627-1633.

Трубочеева Н.В., Кравцова Л.А., Девяткина Э.П., Ефремова Т.Т., Синявская М.Г., Шумный В.К., Першина Л.А. Гетероплазматическое и гомоплазматическое состояние митохондриальной и хлоропластной ДНК у потомков отдаленных гибридов мягкой пшеницы разного происхождения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):160-169.

Шульдин А.Ф. Генетические закономерности расщепления отдаленных гибридов растений. Проблемы отдаленной гибридизации растений. София: Болгарская Академия наук. 1978: 33-44.

Abbott R.J., Ireland H.I., Joseph L., Davies M.S., Rogers H.J. Recent plant speciation in Britain and Ireland: origins, establishment and evolution of four new hybrid species. Proc. Roy. Irish Acad. 2005;105:173-183.

Ahmed T.A., Tsujimoto H., Sasakuma T. QTL analysis of fertility-restoration against cytoplasmic male sterility in wheat. Genes Genet. Syst. 2001;76:33-38.

Ainouche M.L., Baumel A., Salmon A. *Spartina anglica* C.E. Hubbard: a natural model system for analyzing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. Biol. J. Linn. Soc. 2004;82:475-484.

Aksyonova E., Sinyavskaya M., Danilenko N., Pershina L., Nakamura C., Davydenko O. Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley-wheat hybrids during backcrosses with wheat parents. Genome. 2005;48:761-769.

Aleza P., Juárez J., Cuenca J., Ollitrault P., Navarro L. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x × 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. Plant Cell Rep. 2012;31:1723-1735.

Alvarez J.B., Ballesteros J., Sillero J.A., Martin L.M. *Tritordeum*: a new crop of potential importance in the food industry. Hereditas. 1992;116:193-197.

Ananiev E.V., Riera-Lizarazu O., Rines H.W., Phillips R.L. Oat-maize chromosome addition lines: A new system for mapping the maize genome. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997;94:3524-3529.

Anderson E. Introgressive hybridization. Biol. Rev. 1953;28:280-307.

Asakura N., Nakamura C., Ohtsuka I. A nuclear compatibility gene, *Ncc-tmp*, of *Triticum timopheevii* for the cytoplasm of *Aegilops squarrosa*. Genes Genet. Syst. 1997;72:71-78.

Banga S.S., Deol J.S., Banga S.K. Alloplasmic male-sterile *Brassica juncea* with *Enarthrocarpus lyratus* cytoplasm and the introgression of gene(s) for fertility restoration from cytoplasm donor species. Theor. Appl. Genet. 2003;106:1390-1395.

Bentley K.E., Mande J.R., McCauley D.E. Paternal leakage and heteroplasmy of mitochondrial genomes in *Silene vulgaris*: evidence from experimental crosses. Genetics. 2010;185:961-968.

- Bertin I., Fish L., Foote T., Knight E., Snape J., Moore G. Development of consistently crossable wheat genotypes for alien wheat gene transfer through fine-mapping of the *Kr1* locus. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:1371-1381.
- Blakeslee A.F., Avery A.C. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J. Hered.* 1937;28(12):393-411.
- Bogdanova V.S. Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:333-339.
- Bombliès K., Lempe J., Epple P., Warthmann N., Lanz C., Dangl J.L., Weigel D. Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. *PLoS Biol.* 2007; 5(9):e236.
- Bombliès K., Weigel D. Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8:382-393.
- Brautigam K., Dietzel I., Pfannschmidt T. Plastid-nucleus communication: anterograde and retrograde signaling in the development and function of plastids. *Cell Mol. Biol. Plastids.* 2007;19:409-455.
- Buggs R.J.A., Zhang L., Miles N., Tate J.A., Gao L., Wei W., Schnable P.S., Barbazuk W.B., Soltis P.S., Soltis D.E. Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant. *Curr. Biol.* 2011;21:551-556.
- Bushnell C., Spielman M., Scott R.J. The basis of natural and artificial postzygotic hybridization barriers in Arabidopsis species. *Plant Cell.* 2003;15:1430-1442.
- Comai L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploids plants. *Plant Mol. Biol.* 2000;43:387-399.
- Crismani W., Girard C., Mercier R. Tinkering with meiosis. *J. Exp. Bot.* 2013;64:55-65.
- Crosatti C., Quansah L., Maré C., Giusti L., Roncaglia E., Atienza S.G., Cattivelli L., Fait A. Cytoplasmic genome substitution in wheat affects the nuclear-cytoplasmic cross-talk leading to transcript and metabolite alterations. *BMC Genom.* 2013;14:868-889.
- Davies D.R. Chromosome elimination in inter-specific hybrids. *Heredity.* 1974;32:267-270.
- Devaux P. The *Hordeum bulbosum* (L.) method. *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual.* Eds M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 2003; 15-19.
- Dilkes B.P., Comai L. A differential dosage hypothesis for parental effects in seed development. *Plant Cell.* 2004;16:3174-3180.
- Eilam T., Anikster Y., Millet E., Manisterski J., Feldman M. Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome.* 2008;51: 616-627.
- Ellis J.R., Bentley K.E., McCauley D.E. Detection of rare paternal chloroplast inheritance in controlled crosses of the endangered sunflower *Helianthus verticillatus*. *Heredity.* 2008;100:574-580.
- Ellstrand N.C., Schierenbeck K.A. Hybridization as stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000;97:7043-7050.
- Farbos I., Mouras A., Bereterbide A., Glimelius K. Defective cell proliferation in the floral meristem of alloplasmic plants of *Nicotiana tabacum* leads to abnormal floral organ development and male sterility. *Plant J.* 2001;26:131-142.
- Feldman M., Levy A.A. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109:250-258.
- Fujii S., Toriyama K. Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. *Plant Cell Physiol.* 2008;49:1484-1494.
- Gaeta R.T., Yoo S.Y., Pires J.C., Doerge R.W., Chen Z.J., Osborn T.C. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70 mer oligo microarrays. *PLoS ONE.* 2009;4:e4760.
- Geerts P., Toussaint A., Mergeai G., Baudoin J.P. Phaseolus immature embryo rescue technology. *Method. Mol. Biol.* 2011;710:117-129.
- Gernand D., Houben A., Pickering R., Rutten T. Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenet. Genome Res.* 2006;114:169-174.
- Gernand D., Rutten T., Varshney A., Rubtsova M., Prodanovic S., Brüß C., Kumlehn J., Matzk F., Houben A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell.* 2005;17:2431-2438.
- Gerstel D.U., Burns J.A., Burk L.G. Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana*, restoration of fertility, and the nucleolus. *Genetics.* 1978; 89:157-169.
- Hattori N., Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus-cytoplasm hybrids. *Genetics.* 2002;160(4):1619-1630.
- He G., Zhu X., Elling A.A., Chen L., Wang X., Guo L., Liang M., He H., Zhang H., Chen F., Qi Y., Chen R., Deng X-Q. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell.* 2010;22:17-33.
- Ho K.M., Kasha K.J. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. *Genome.* 1975;81:263-273.
- Hossain K.G., Riera-Lizarazu O., Kalavacharia V., Vales M.I., Rust J.L., Maan S.S., Kianian S.F. Molecular cytogenetic characterization of an alloplasmic durum wheat line with a portion of chromosome 1D of *Triticum aestivum* carrying the *scs^{ae}* gene. *Genome.* 2004;47: 206-214.
- Houben A., Sanei M., Pickering R. Barley doubled-haploid production by uniparental chromosome elimination. *Plant Cell Tiss. Org.* 2011;104:321-327.
- Inagaki M.N., Mujeeb-Kazi A. Production of polyhaploids of hexaploid wheat using stored pearl millet pollen. *Euphytica.* 1998;100(1-3): 253-259.
- Ishii T., Ueda T., Tanaka H., Tsujimoto H. Chromosome elimination by wide hybridization between *Triticeae* or oat plant and pearl millet: pearl chromosome dynamics in hybrid embryo cells. *Chromosome Res.* 2010;18:821-883.
- Ito T., Konno I., Kubota S., Ochiai T., Sonoda T., Hayashi Y., Fukuda T., Yokoyama J., Nakayama H., Kameya T., Kanno A. Production and characterization of interspecific hybrids between *Asparagus kiusianus* Makino and *A. officinalis* L. *Euphytica.* 2011;182:285-294.
- Janeja H.S., Banga S.K., Bhaskar P.B., Banga S.S. Alloplasmic male sterile *Brassica napus* with *Enarthrocarpus lyratus* cytoplasm: introgression and molecular mapping of an *E. lyratus* chromosome segment carrying a fertility restoring gene. *Genome.* 2003;46: 792-797.
- Jansky S. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding.* 2006;125:1-12.
- Jesse D., Woodson J.D., Chory J. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 2008;9: 383-395.
- Jiang J., Chen P., Friebe B., Raupp W.J., Gill B.S. Alloplasmic wheat – *Elymus ciliaris* chromosome addition lines. *Genome.* 1993;36: 327-333.
- Kaul M.L.H. Male Sterility in Higher Plants. Berlin; Heidelberg; N.Y.; London; Paris; Toronto: Springer-Verlag, 1988.
- Kiang A.S., Connolly V., McConnell D.J., Kavanagh T.A. Paternal inheritance of mitochondria and chloroplasts in *Festuca pratensis-Lolium perenne* intergeneric hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1994;87: 681-688.
- Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. Evidence of paternal transmission of mitochondrial DNA in a nucleus-cytoplasm hybrid of timopheevi wheat. *Genes. Genet. Syst.* 2002;77:243-250.
- Koba T., Shimada T. Variations in the crossability of common wheat cultivars with cultivated barley. *Hereditas.* 1992;116:187-192.
- Kruse A. An *in vivo/in vitro* embryo culture technique. *Hereditas.* 1974; 77:219-224.
- Lai Z., Nakazato T., Salmaso M., Burke J.M., Tang S., Knapp S.J., Rieseberg L.H. Extensive chromosomal repatterning and evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species. *Genetics.* 2005;171: 291-303.

- Laibach F. Das taubwerden der bastardsamen und die künstliche anzucht früh absterbender bastardembryonen. *Ztschr. Bot.* 1925;17: 417-485.
- 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.
- Lange L., Wojciechowska B. The crossing of common wheat (*T. aestivum* L.) with cultivated rye (*S. cereale* L.). I. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica.* 1976;25: 609-620.
- Laurie D.A., Bennett M.D. The effect of the crossability loci *Kr1* and *Kr2* on fertilization frequency in hexaploid wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 1987;73:403-409.
- Lee J.A. Genetics of *D3*, complementary lethality in *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *J. Hered.* 1981;72:299-300.
- Levin D.A. The cytoplasmic factor in plant speciation. *Syst. Bot.* 2003; 28(1):5-11.
- Li G.R., Ji W., Wang G., Zhang J.X., Wang Y.J. An improved embryo-rescue protocol for hybrid progeny from seedless *Vitis vinifera* grapes × wild Chinese *Vitis* species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2014a;50:110-120.
- Li J., Sun Q., Yu N., Zhu J., Zou X., Qi Z., Ghani M.A., Chen L. The role of small RNAs on phenotypes in reciprocal hybrids between *Solanum lycopersicum* and *S. pimpinellifolium*. *BMC Plant Biol.* 2014b;14:296-306.
- Liu H.Y., Xu C.G., Zhang Q. Male and female gamete abortions, and reduced affinity between the uniting gametes as the causes for sterility in an indica/japonica hybrid in rice. *Sex. Plant Reprod.* 2004; 17:55-62.
- Maan S.S. Transfer of the species specific cytoplasm (*scs*) from *Triticum timopheevii* to *Triticum turgidum*. *Genome.* 1992;35:238-243.
- Mahé L., Le Pierrès D., Combes M.-C., Lashermes P. Introgressive hybridization between the allotetraploid *Coffea arabica* and one of its diploid ancestors, *Coffea canephora*, in an exceptional sympatric zone in New Caledonia. *Genome.* 2007;50:316-324.
- Michalak de Jimenez M.K., Bassi F.M., Ghavami F., Simons K., Dizon R., Seetan R.I., Alnemer L.M., Denton A.M., Dođramaci M., Šimková H., Doležel J., Seth K., Luo M.-C., Dvorak J., Gu Y.Q., Kianian S.F. A radiation hybrid map of chromosome 1D reveals synteny conservation at a wheat speciation locus. *Funct. Integr. Genomics.* 2013;13:19-32.
- Mizuno N., Hosog N., Park P., Takum S. Hypersensitive response-like reaction is associated with hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. *PLoS ONE.* 2010;5:1-16.
- Molnár-Láng M., Linc G., Logojan A., Sutka J. Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) × winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome.* 2000;43: 1045-1054.
- Molnár-Láng M., Linc G., Sutka J. Transfer of the recessive crossability allele *kr1* from Chinese Spring into the winter wheat variety Martonvásári 9. *Euphytica.* 1996;90:301-305.
- Moreno P.E., Caetano C.M., Olaya C.A., Agrono T.C., Torres E.A. Chromosome elimination in intergeneric hybrid of *Oryza sativa* × *Luziola peruviana*. *Agr. Sci.* 2014;5:1344-1350.
- Moreno E.M.S., Speranza P.R., Laque J.M.R., Neffà V.G.S. Natural hybridization among subspecies of *Turnera sidoides* L. (Passifloraceae) revealed by morphological and genetic evidence. *Plant Syst. Evol.* 2015;301:883-892.
- Nakano N., Mizuno N., Tosa Y., Yoshida K., Park P., Takumi S. Accelerated senescence and enhanced disease resistance in hybrid chlorosis lines derived from interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. *PLoS ONE.* 2015;10. DOI 10.1371/journal.pone.0121583.
- Ng D.W.-K., Lu J., Chen Z.J. Big roles for small RNAs in polyploidy, hybrid vigor, and hybrid incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012;15:154-161.
- Niroula R.K., Bimb H.P. Overview of wheat × maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. *World Appl. Sci. J.* 2009;7: 1037-1045.
- Niu Z., Jiang A., Hammad W.A., Oladzadabbasabadi A., Xu S.S., Merougoum M., Elias E.M. Review of doubled haploid production in durum and common wheat through wheat × maize hybridization. *Plant Breeding.* 2014;133:313-320.
- Pathania A., Bhat S.R., Dinesh Kumar V., Ashutosh K.P.B., Prakash S., Chopra V.L. Cytoplasmic male sterility in alloplasmic *Brassica juncea* carrying *Diplotaxis catholica* cytoplasm: molecular characterization and genetics of fertility restoration. *Theor. Appl. Genet.* 2003;107:455-461.
- Pelletier G., Budar F. The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007;18:121-125.
- Pershina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P. Biotechnological and cytogenetic aspects of producing new wheat genotypes using hybrids. *Euphytica.* 1998;1006(1-3):239-244.
- Pershina L.A., Shumny V.K. Simulating processes of species formation and rise of biodiversity on the base of wide hybridization of cereals. Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia. V. 1. Basic problems of species and ecosystems evolution. Part 2. Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia: Informational Technologies and Modelling. Novosibirsk: ICG. 2000;88-91.
- Pires J.C., Lim K.Y., Kovarik A., Matyásek R., Boyd A., Leitch A.R., Leitch I.J., Bennett M.D., Soltis P.S., Soltis D.E. Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Am. J. Bot.* 2004;91:1022-1035.
- Prakash S., Ahuja I., Upreti C., Kumar V.D., Bhat S.R., Kirti P.B., Chopra V.L. Expression of male sterility in alloplasmic *Brassica juncea* with *Erucastrum canariense* cytoplasm and the development of a fertility restoration system. *Plant Breeding.* 2001;120:479-482.
- Riera-Lizarazu O., Rines H.W., Phillips R.L. Cytological and molecular characterization of out × maize partial hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93:123-135.
- Rieseberg L.H., Carney S.E. Plant hybridization. *New Phytol.* 1998; 140:599-624.
- Rieseberg L.H., Wendel J.F. Introgression and its consequences in plants. Ed. R.G. Harrison. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process.* Oxford Univ. Press, 1993;70-109.
- Rieseberg L.H., Wills J.H. Plant speciation. *Science.* 2007;317:910-913.
- Sanei M., Pickering R., Kumke K., Nasuda S., Houben A. Loss of centromeric histone H3 (*CENH3*) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011;108:498-505.
- Seehausen O. Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 2004;19:198-207.
- Sharma G., Srivalli B., Khanna-Chopra R. Hybrid necrosis in wheat – a genetic system showing reduced capacity to detoxify reactive oxygen species leading to programmed cell death. *Indian J. Biotechnol.* 2003;2(1):17-25.
- Shimada T., Kikuchi Y., Fujimoto R., Kishitani S. An alloplasmic male-sterile line of *Brassica oleracea* harboring the mitochondria from *Diplotaxis muralis* expresses a novel chimeric open reading frame, *orf72*. *Plant Cell Physiol.* 2006;47:549-553.
- Silkova O.G., Shchapova A.I., Shumny V.K. Patterns of meiosis in ABDR amphihaploids depend on the specific type of univalent chromosome division. *Euphytica;* 2011;178:415-426.
- Sinha P., Tomar S.M.S., Vinod Singh V.K., Balyan H.S. Genetic analysis and molecular mapping of new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevii* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Genetics.* 2013;141:431-441.
- Sobel J.M., Chen G.F., Watt L.R., Schemske D.W. The biology of speciation. *Evolution.* 2010;64:295-315.
- Soliman K., Fedak G., Allard R.W. Inheritance of organelle DNA in barley and *Hordeum* × *Secale* intergeneric hybrids. *Genome.* 1987; 29:867-872.

- Subrahmanyam N.C., Bothmer R. von. Interspecific hybridization with *Hordeum bulbosum* and development of hybrids and haploids. *Hereditas*. 1987;106:119-127.
- Suzuki T., Nakamura C., Mori N., Kaneda C. Overexpression of mitochondrial genes in alloplasmic common wheat with a cytoplasm of wheatgrass (*Agropyron trichophorum*) showing depressed vigor and male sterility. *Plant Mol. Biol.* 1995;27:553-565.
- Tate J.A., Ni Z., Scheen A.-C., Koh J., Gilbert C.A., Lefkowitz D., Chen Z.J., Soltis P.S., Soltis D.E. Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics*. 2006;173:1599-1611.
- Tikhenko N., Rutten T., Tsvetkova N., Dobrovolskaya O., Zaynali Nezhad K., Roder M.S., Börner A. Hybrid dwarfness in crosses between wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): a new look at an old phenomenon. *Plant Biol. (Stuttg)*. 2015;17:320-326.
- Tsukamoto N., Asakura N., Hattori N., Takumi S., Mori N., Nakamura C. Identification of paternal mitochondrial DNA sequences in the nucleus-cytoplasm hybrid of tetraploid and hexaploid wheat with D and D2 plasmon from *Aegilops* species. *Curr. Genet.* 2000;38:208-221.
- Tsunewaki K. Aneuploid analyses of hybrid necrosis and hybrid chlorosis in tetraploid wheats using the D genome chromosome substitution lines of durum wheat. *Genome*. 1992;35:594-601.
- Tsunewaki K. Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. *Methods of Genome Analysis in Plant*. Ed. P.P. Jauhar. Boca Raton; New York; London; Tokyo: CRC Press, 1996;271-299.
- Tu Y., Sun J., Ge X., Li Z. Chromosome elimination, addition and introgression in intertribal partial hybrids between *Brassica rapa* and *Isatis indigotica*. *Ann. Bot.* 2009;103:1039-1048.
- Van Tuyl J.M., Van Diën M.P., Van Creijl M.G.M., Van Kleinwee T.C.M., Franken J., Bino R.J. Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci.* 1991;74:115-126.
- Vinkennoog V., Bushell C., Spielman M., Adams S., Dickinson H.G., Rod J., Scott R.J. Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Mol. Biotechnol.* 2003;25:149-184.
- Vu H.Q., Iwata M., Yamauchi N., Shigyo M. Production of novel alloplasmic male sterile lines in *Allium cepa* harbouring the cytoplasm from *Allium roylei*. *Plant Breeding*. 2011;130:469-475.
- Wang H., Jiang J., Chen S., Qi X., Fang W., Guan Z., Teng N., Liao Y., Chen F. Rapid genetic and epigenetic alterations under intergeneric genomic shock in newly synthesized *Chrysanthemum morifolium* × *Leucanthemum paludosum* hybrids (Asteraceae). *Genome Biol. Evol.* 2014;6:247-259.
- Widmer A., Lexer C., Cozzolino S. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*. 2009;102:31-38.
- Yang D., Li W., Li S., Yang X., Wu J., Cao Z. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. *Plant Growth Regul.* 2007;51:63-71.
- Yang J., Zhang M., Yu J. Mitochondrial retrograde regulation tuning fork in nuclear genes expressions of higher plants. *J. Genet. Genomics*. 2008;35:65-71.
- Zhou W.M., Yoshida K., Shintaku Y., Takeda G. The use of IAA to overcome interspecific hybrid inviability in reciprocal crosses between *Nicotiana tabacum* L. and *N. repanda* Willd. *Theor. Appl. Genet.* 1991;82:657-661.
- Zhu Y., Saraïke T., Yamamoto Y., Hagita H., Takumi S., Murai K. *Orf-260cra*, a novel mitochondrial gene, is associated with the homeotic transformation of stamens into pistil-like structures (pistillody) in alloplasmic wheat. *Plant Cell Physiol.* 2008;49:1723-1733.

Генетика старения и долголетия

А.А. Москалев^{1, 2, 3, 4}✉, Е.Н. Прошкина^{1, 2}, А.А. Белый^{1, 2}, И.А. Соловьев^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина», Сыктывкар, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Долгопрудный, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Продолжительность жизни является комплексным количественным признаком, вносящим определяющий вклад в дарвиновскую приспособленность. Раскрытие генетической природы долгожительства – фундаментальная проблема эволюции онтогенеза, эволюционной генетики и молекулярной геронтологии. В оптимальных условиях существования продолжительность жизни определяется скоростью старения. В свою очередь, феномен старения состоит из взаимосвязанных процессов, происходящих на организменном, тканевом, клеточном, молекулярно-генетическом уровнях. Они включают дерегуляцию процессов поддержания гомеостаза, метаболических реакций и передачи внутри- и межклеточных сигналов, накопление неспособных к делению клеток, поврежденных органелл и макромолекул, эпигенетические изменения и генетическую нестабильность. Задачей настоящего обзора является обобщение имеющихся сведений об основных генетических детерминантах продолжительности жизни и старения. Рассмотрены гены и сигнальные каскады, влияющие на скорость старения через регуляцию стресс-ответа, обмена веществ, роста клеток и организма, поддержание целостности генома и протеома, качественного и количественного состава митохондрий, воспалительного ответа, апоптоза и селекции жизнеспособных клеток, а также циркадных ритмов. Перераспределение энергетических ресурсов между процессами роста и самоподдержания жизнеспособности может запустить либо отключить «программу долгожительства», обеспечивая повышенную устойчивость к стрессам и замедленное старение организма. На основании анализа геропротекторного потенциала регуляции активности рассматриваемых генов были выделены возможные подходы для замедления старения и достижения здорового долголетия. К ним отнесены восстановление гетерохроматина; подавление ретротранспозиций; устранение клеток с анеупloidией; восстановление кислотности лизосом; удлинение теломер; подавление хронического воспаления; устранение перекрестных сшивок белков; элиминация сенесцентных клеток; восстановление уровней НАД⁺; ингибирование mTOR, S6K, TGF-β, AT1; контролируемая активация генов «программы долгожительства» *FOXO*, *AMPK*, *PGC1α*, *NRF2*.

Ключевые слова: продолжительность жизни; старение; гены долголетия; программа долголетия.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Москалев А.А., Прошкина Е.Н., Белый А.А., Соловьев И.А. Генетика старения и долголетия. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):426-440. DOI 10.18699/VJ16.171

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Moskalev A.A., Proshkina E.N., Belyi A.A., Solovyev I.A. Genetics of aging and longevity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):426-440. DOI 10.18699/VJ16.171

УДК 575, 577.24

Поступила в редакцию 19.04.2016 г.

Принята к публикации 22.04.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

Genetics of aging and longevity

A.A. Moskalev^{1, 2, 3, 4}✉, E.N. Proshkina^{1, 2},
A.A. Belyi^{1, 2}, I.A. Solovyev^{1, 2}

¹ Institute of Biology Komi SC UrB RAS, Syktывkar, Russia

² Syktывkar State University, Syktывkar, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

⁴ Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

Lifespan is a complex quantitative characteristic that makes a significant contribution to the Darwinian adaptiveness. The disclosure of the genetic structure of longevity is a fundamental problem of the evolution of ontogeny, evolutionary genetics and molecular gerontology. Under optimal conditions, the lifespan is determined by the aging rate. The aging process is made up of interrelated processes that take place at the organismal, tissue, cellular, molecular and genetic levels. These include deregulation processes of homeostasis maintenance, metabolic reactions and sending intra- and intercellular signals, accumulation of senescent cells, damaged organelles and macromolecules, epigenetic changes and genetic instability. The objective of this review is to summarize the available information about underlying genetic determinants of longevity and aging. Genes and signaling pathways that regulate stress response, metabolism, growth of cells and organism, maintaining of genome and proteome integrity, qualitative and quantitative mitochondria composition, inflammatory response, apoptosis and selection of viable cells, as well as circadian rhythms were considered. The redistribution of energy resources from one pathway to the other can induce or inhibit the "longevity program", providing increased vitality and aging slowdown. Based on the analysis of geroprotective potential of examined genes' regulation, main targets have been identified to slowdown aging and achieve healthy longevity. These trends include heterochromatin recovery, retrotransposition suppression, aneuploidy elimination; restoring the acidity of lysosomes; telomere elongation; suppression of chronic inflammation; elimination of protein cross-links; elimination of senescent cells; recovery of NAD⁺ levels; inhibition of mTOR, S6K, TGF-β, AT1; controlled activation of the "longevity program" genes *FOXO*, *AMPK*, *PGC1α*, *NRF2*.

Key words: lifespan; aging; longevity genes; longevity program.

Продолжительность жизни, т. е. способность поддерживать жизнеспособность организма длительное время, является комплексным количественным признаком, вносящим определяющий вклад в дарвиновскую приспособленность. Раскрытие генетической структуры долгожительства – фундаментальная проблема эволюции онтогенеза, эволюционной генетики и молекулярной геронтологии (Москалев, 2008).

В оптимальных для жизнедеятельности условиях существования продолжительность жизни определяется скоростью старения. В свою очередь, феномен старения состоит из взаимосвязанных механизмов на различных биологических уровнях. Организменный уровень проявления старения включает в себя неспособность поддерживать постоянство внутренней среды организма, функциональные расстройства и увеличение восприимчивости к возрастным заболеваниям, приводящим к смерти (Zhang et al., 2015). Эти преобразования часто связаны с изменением количества клеток и качественного состава тканей, нарушением межклеточной сигнализации и активности систем ответа на стресс и метаболические изменения.

На тканевом уровне наблюдается хроническое воспаление, которое выступает драйвером многих возраст-зависимых заболеваний, прежде всего сердечно-сосудистых и нейродегенеративных. Нарушается регуляция метаболизма в результате отклонения от нормы механизмов сигнализации, связанных с реагированием на присутствие в среде макронутриентов. Как будет показано дальше, у стареющего организма изменяется регуляция метаболических путей, ассоциированных с инсулин/инсулиноподобным фактором роста (IGF)-1, сиртуинами, 5'-AMP-активируемой протеинкиназой (AMPK) и мишенью рапамицина (mTOR) (Zhang et al., 2015).

Нарушение работы клеток – еще один уровень, на котором происходит старение. С возрастом увеличивается количество неспособных к делению (сенесцентных) клеток; усиливается образование активных форм кислорода в результате снижения активности митохондриальной дыхательной цепи и антиокислительных ферментов; запускается ответ на денатурацию белков в эндоплазматической сети, а также наблюдается неспособность клеток утилизировать поврежденные белки и поддерживать протеостаз при помощи лизосом и протеасом (Tomaru et al., 2012).

На молекулярном уровне старение проявляется неспособностью клетки полностью восстановить поврежденные макромолекулы. При старении накапливаются поврежденные участки ДНК (Maslov et al., 2013), генные и хромосомные мутации, укорачиваются теломеры (Codd et al., 2013), аккумулируются эпигенетические модификации ДНК и гистонов (Hannum et al., 2013), приводящие к перестройкам хроматина (Chen et al., 2014). При этом происходят гетерохроматинизация важных для жизнедеятельности клеткой участков хромосом (SAHF, старение-ассоциированный гетерохроматин) (Corpet, Stucki, 2014) и дегетерохроматинизация повторяющихся последовательностей генома, ведущая к генетической нестабильности (Tsurumi, Li, 2012).

Регуляция стресс-ответа

Существует множество свидетельств того, что стрессоустойчивость связана с долголетием. Например, двухстворчатый моллюск *Arctica islandica*, отдельные особи которого доживают до 507 лет, обладает высокой степенью стрессоустойчивости (Ungvari et al., 2011). Фибробласты голого землекопа, живущего более 30 лет грызуна, в несколько раз устойчивее к генотоксикантам и ксенобиотикам, чем аналогичные клетки мышей, живущих 2,5 года (Lewis et al., 2012). Напротив, короткоживущие мутанты модельных организмов имеют сниженную устойчивость к неблагоприятным факторам среды (Vermeulen et al., 2005). Селекция линий дрозофил на устойчивость к одному из стресс-факторов (например, голоданию) приводит к повышению устойчивости к другим стресс-факторам и увеличению продолжительности жизни (Harshman et al., 1999).

По всей видимости, взаимообусловленность этих двух явлений возникла в эволюции в рамках формирования генетической «программы долгожительства» (Moskalev et al., 2014). Благодаря ей в условиях воздействий стресс-факторов организм переходит в режим поддержания жизнеспособности. При этом животные повышают свою стрессоустойчивость и приостанавливают рост и репродукцию. В качестве побочного эффекта происходит замедление процессов старения, что позволяет удлинить продолжительность жизни, чтобы пережить неблагоприятные условия среды и затем приступить к размножению. Запустить «программу долгожительства» возможно искусственным путем, вызывая мутации в генах, при благоприятных условиях окружающей среды, подавляющих ее реализацию. Гормоны оси GH/IGF-1 и контролируемые ими сигнальные каскады (рецептор IGF-1 и его субстраты, киназы PI3K, AKT, mTOR, S6K) в благоприятных условиях окружающей среды обеспечивают процессы роста и размножения организма, подавляя при этом энергозатратные процессы стрессоустойчивости. Другим путем индукции этой программы является активация генов стресс-ответа, многие из которых играют ключевую роль в реализации долгожительства. К ним можно отнести гены, кодирующие факторы транскрипции FOXO, NRF2, HIF-1, киназу JNK, сиртуины и ряд других белков.

Сверхактивация FOXO связана с увеличением продолжительности жизни и стрессоустойчивостью модельных животных (Argon, Gidalevitz, 2015). Полиморфизмы в генах, кодирующих FOXO1a и FOXO3a у человека, также ассоциированы с долголетием (Tan et al., 2013). Более того, аллель *G* полиморфизма *rs2802292* способен снизить старческую смертность, связанную с заболеваниями сердечно-сосудистой системы (Willcox et al., 2016). В благоприятных условиях существования активность FOXO в клетке подавлена сигнальным каскадом, запускаемым гормоном роста и IGF-1. Однако в стрессовых условиях FOXO индуцируется и вызывает экспрессию генов клеточной защиты, таких как ген белка теплового шока *Hsp70* (Hsu et al., 2003), ген репарации ДНК *GADD45* (Tran et al., 2002), гены аутофагии *LC3B*, *Gabara11* и *Atg12* (Cheong et al., 2015), лизосомальный ген *Lamp1*, гены убиквитин-протеасомальной деградации белков (Demontis, Perrimon,

2010). Реализация функций FOXO происходит с участием многих других генов, ассоциированных с долголетием, например *AMPK*, *PGC1 α* , *P53*, *LKB1*, *SIRT1*, *SIRT6*, *NRF1*, *ULK1*, *SREBP1*, *HIF1*, которые задействованы в биогенезе митохондрий, гликолизе, окислении жирных кислот и митофагии, митогормезисе (Fang et al., 2016).

Ядерный фактор NRF2 – транскрипционный регулятор более 500 генов, главным образом отвечающий за антиоксидантную защиту клеток, детоксикацию ксенобиотиков и токсичных металлов (Pall, Levine, 2015). Установлено, что сверхэкспрессия гомолога *NRF2* повышает выживаемость дрозофил в условиях окислительного стресса, тогда как РНК-интерференция, напротив, делает мух более чувствительными к действию прооксиданта параквата (Sykiotis, Bohmann, 2008). Мутация гена *Keap1*, кодирующего его негативный регулятор, вызвала увеличение продолжительности жизни животных (Sykiotis, Bohmann, 2008). Кроме того, сравнение долгоживущего голого землекопа с девятью другими видами грызунов показало, что активность компонентов сигнального пути NRF2 положительно коррелирует с максимальной продолжительностью жизни. При этом для его негативного регулятора *Keap1* показана обратная тенденция (Lewis et al., 2015). Активация NRF2 наблюдается при применении эффективных средств для профилактики и лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, почек, легких, печени, метаболических и аутоиммунных расстройств, хронического воспаления, эпилепсии, предупреждения образования злокачественных опухолей (Pall, Levine, 2015).

Транскрипционный фактор HIF-1 индуцируется в ответ на гипоксию и регулирует экспрессию генов антигипоксических факторов, стимулируя рост сосудов и тромбоцитов, транспортную функцию крови, сдвиг в сторону анаэробного метаболизма за счет снижения потребления митохондриями кислорода, а также контроля транспорта глюкозы и гликолиза. На модели нематод было показано, что активация HIF-1 при искусственно сниженном уровне активности митохондрий (Khan et al., 2013), а также сверхэкспрессия *HIF-1* генетическими методами или в условиях гипоксии продлевают жизнь (Lee et al., 2010a; Leiser, Kaerberlein, 2010).

Сиртуины – семейство никотинамид аденин динуклеотид (NAD⁺)-зависимых ферментов, обладающих деацетилазной и АДФ-рибозилтрансферазной активностью (Smith et al., 2000). С точки зрения детерминации долголетия наибольший интерес представляют SIRT1 и его гомолог у беспозвоночных животных и дрожжей Sir2. Активность деацетилазы SIRT1 индуцируется при увеличении внутриклеточного соотношения NAD⁺/NADH и в ответ на окислительный стресс. Например, его гомолог Sir2 ответственен за положительный эффект ограничения калорий на продолжительность жизни у таких организмов, как дрожжи, нематоды и мухи (Chen, Guarente, 2007). SIRT1 у млекопитающих является ключевым регулятором физиологических процессов, связанных с возраст-зависимыми заболеваниями, в частности сахарным диабетом 2-го типа, ожирением, нейродегенеративными расстройствами и раком (Cha, Kim, 2013; Chang, Guarente, 2014;

Herskovits, Guarente, 2014), и играет важную роль в таких процессах, как апоптоз (Cohen et al., 2004) и различные стресс-реакции (Brooks, Gu, 2009). Умеренная сверхэкспрессия *SIRT1* у мышей во всем теле и в головном мозге приводит к уменьшению количества маркеров старения и опухолевых заболеваний (Herranz et al., 2010; Satoh et al., 2013). Положительные эффекты на продолжительность жизни и состояние здоровья животных оказывают и другие представители семейства сиртуинов. Деацетилаза SIRT6 стимулирует активность различных белков репарации ДНК в ответ на стресс (Mao et al., 2011). Она подавляет генетическую нестабильность, связанную с активизацией ретротранспозона LINE-1 (Van Meter et al., 2014). У мышей с мутацией *SIRT6* в некоторых тканях наблюдали признаки ускоренного старения (Mostoslavsky et al., 2006), а самцы со сверхэкспрессией *SIRT6* жили дольше контрольных животных (Kanfi et al., 2012).

JNK – это эволюционно консервативная протеинкиназа, активируемая в ответ на стрессоры. С одной стороны, JNK индуцирует гены, обеспечивающие защиту клетки от негативных воздействий путем активации факторов транскрипции FOXO и AP-1, а с другой – влияет на клеточный метаболизм, рост и деление через инсулиновый/IGF-1 сигнальный путь (Biteau et al., 2011). Нарушение регуляции JNK приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний, метаболических расстройств и рака (Biteau et al., 2011). В экспериментах на дрозофилах показано, что особи со сверхэкспрессией гомолога гена *JNK* в нервной системе обладают повышенной продолжительностью жизни и устойчивостью к индуктору окислительного стресса – параквату (Wang et al., 2003). В то же время мутанты и мухи с РНК-интерференцией *JNK*, напротив, мало живут и более чувствительны к стресс-факторам (Biteau et al., 2010). У нематод с повышенной активностью *KGB-1* (гомолог *JNK*) было показано увеличение продолжительности жизни и устойчивости к тяжелым металлам (Oh et al., 2005). Однако позже было обнаружено, что данный эффект проявляется только у развивающихся животных, а сверхактивация *KGB-1* у взрослых червей оказывает негативное действие, снижая продолжительность жизни и стрессоустойчивость (Twumasi-Boateng et al., 2012). В исследованиях на других модельных объектах также показано отрицательное действие активности *JNK*. Нокаут *JNK* с помощью РНК-интерференции у коловраток *Brachionus manjavacas* приводил к увеличению продолжительности жизни (Snell et al., 2014). В исследованиях на мышцах JNK1 был описан как белок, провоцирующий фиброз звездчатых клеток печени (Zhao et al., 2014), а нокаут *JNK3* улучшал состояние животных при мышечной атрофии спинного мозга (Genabai et al., 2015).

Регуляция метаболизма и старение

Гормон роста, или соматотропин (GH), и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) вызывают множество плейотропных эффектов (Anisimov, Bartke, 2013). Основная физиологическая функция этих гормонов состоит в стимуляции роста. Гормон-рецепторный комплекс GH/GHR, обладающий тирозинкиназной активностью, в клетках печени активирует путь JAK/STAT, стимулиру-

ющий экспрессию IGF-1. Циркулирующий в крови фактор роста IGF-1 взаимодействует с рецептором IGF-1R на поверхности клеток периферических тканей. Рецепторы трансдуцируют сигнал к белкам IRS, передающим далее сигнал на киназы PI3K, АКТ/ПКВ и mTOR (Junnila et al., 2013). В последнем случае активируется киназа S6K, которая вызывает интенсификацию метаболизма и роста клеток (Junnila et al., 2013). С другой стороны, как уже упоминалось, происходит деактивация энергозатратного процесса поддержания стрессоустойчивости клеток. Нарушение описанных эффектов IGF-1 различными методами продлевает жизнь, в том числе у дрожжей, нематод, насекомых (Kenyon et al., 1993; Tatar et al., 2001) и мышей (Ding et al., 2013). Исследования человеческих популяций с подавлением GH/IGF-1 сигнального пути привели к похожим выводам (Le Bourg, 2016).

Сигнальный путь трансформирующего ростового фактора бета (TGF β) вовлечен во многие клеточные процессы, такие как рост, дифференциация, апоптоз, поддержание гомеостаза (Aschneq, Downey, 2016). Рецепторы TGF β фосфорилируют транскрипционные факторы SMAD, которые регулируют экспрессию генов-мишеней, таких как *FOXO3*, *TERT*, *MYC*, *CDKN2B*, *CDKN1A*, *APP*, *TNC*, *MET* (Weiss, Attisano, 2013). Эти гены обеспечивают дифференциацию остеобластов, нейрогенез, вентральную специализацию мезодермы, развитие гонад, ангиогенез, неогенез внеклеточного матрикса, участвуют в аресте G1-фазы клеточного цикла и во многих других процессах (Hannon, Beach, 1994). TGF- β 1 обеспечивает индукцию генов-маркеров клеточного старения и участвует в формировании сенесцентного фенотипа клеток в условиях окислительного стресса (Frippiat et al., 2002). В исследованиях на нематодах было показано, что выключение гена, кодирующего гомолог TGF- β , способствует формированию личинок Dauer и приводит к увеличению продолжительности жизни (Shaw et al., 2007), а также продлению периода репродукции животных (Luo et al., 2009). В то же время полиморфизм в кодирующей TGF- β 1 последовательности ассоциирован с долголетием у человека (Carrieri et al., 2004).

Физиологический ответ на поступление питательных веществ – одно из наиболее изучаемых явлений в биологии старения (Tan, Miyamoto, 2016). Важнейшую роль играет путь Rheb/mTOR/S6K/S6/4E-BP/eIF-4E. Он разделяется на две ветви, регулируемые комплексами mTORC1 и mTORC2. Первый из них отвечает за регуляцию трансляции (активирует p70S6K, белок рибосом S6, фактор инициации трансляции eIF-4E и репрессирует ингибитор трансляции 4E-BP), биогенез рибосом (S6), подавление аутофагии (ингибирование ULK1), осуществление гликолиза (HIF-1), васкуляризацию (VEGF), а также синтез жирных кислот (SREBP1) (Efeyan et al., 2012). Этот белковый комплекс напрямую активируется аминокислотами и белком Rheb на поверхности лизосом. Таким образом, mTORC1 ориентирует метаболизм клетки на дальнейший рост в зависимости от концентрации питательных веществ (Jewell et al., 2013). mTORC2 участвует в перестройке актинового цитоскелета, однако ингибирует транскрипционные факторы стресс-ответа FOXO1 и FOXO3 при

участии комплекса АКТ-ПКС-SGK, активирует фактор транскрипции NF- κ B, провоцируя воспаление, канцерогенез и клеточное старение (Garcia-Martinez, Alessi, 2008). В результате mTORC2 снижает стрессоустойчивость и продолжительность жизни. Ингибирование mTOR каскадов различными способами ведет к продлению жизни у представителей эволюционно далеких таксонов (Jazwinski, Yashin, 2015).

Однако среди генов и белков, координирующих клеточный метаболизм, также присутствуют положительные регуляторы продолжительности жизни. Например, α и β -Klotho – мембранные корецепторы рецепторов факторов роста FGF, которые регулируют уровень гормона роста, IGF-1 и чувствительность тканей к инсулину (Goetz et al., 2012). При отключении гена *Klotho* у мышей появляются признаки ускоренного старения, такие как остеопороз, атеросклероз, эмфизема легких и повреждения почек, что ведет к ранней гибели, а при сверхэкспрессии *Klotho* продолжительность жизни увеличивается (Manya et al., 2010; Dërmaku-Sopjani et al., 2013). Одним из следствий нехватки *Klotho* является нарушение минерального обмена, включая гиперкальцемию, гиперфосфатемию и гиповитаминоз D (Hu et al., 2010). Коррекция уровня фосфатов и витамина D предотвращает преждевременное старение, что является одним из возможных механизмов геропротекторного действия *Klotho* (Bian et al., 2015). Имеются данные о том, что повышение активности *Klotho* с помощью генной терапии увеличивает продолжительность жизни и улучшает показатели здоровья у животных с нехваткой *Klotho* (Wang, Sun, 2014; Xie et al., 2015).

Другим примером белков, способствующих долголетию и регулирующих метаболизм, является АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК). Она запускается при повышении соотношения АМФ/АТФ в результате энергетического голодания клетки, в том числе при голодании, нарушении митохондриального дыхания, гипоксии (Budanov, Karin, 2008). АМПК управляет рядом метаболических путей, например поглощением и утилизацией глюкозы, окислением липидов (Bitto et al., 2015), может влиять на продолжительность жизни и состояние здоровья животных и человека (Salminen, Kaarniranta, 2012), обуславливает положительное действие ограничительной диеты, в том числе, опосредуя индукцию SIRT1 (Cantó, Auwerx, 2011). Активация АМПК продлевает жизнь червям и мухам (Stenesen et al., 2013; Ulgherait et al., 2014). При действии на мышей и червей активаторами АМПК, фенформином и метформинном, также увеличивается продолжительность жизни (Onken, Driscoll, 2010; Martín-Montalvo et al., 2011).

Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPARs), – группа ядерных рецепторов, регулирующих транскрипцию. PPAR γ активирует ряд генов, отвечающих за метаболизм липидов и поддержание уровня глюкозы. Этот белок ответственен за перераспределение жира и развитие связанной со старением невосприимчивости к инсулину, также он подавляет хроническое воспаление, сопровождающее старение (Masternak, Bartke, 2006; Cha et al., 2007; Lee et al., 2010b). Кроме того, геропротекторного действия

текторное действие PPAR γ при старении обеспечивается благодаря индукции аутофагии, необходимой для поддержания клеточного гомеостаза (Lee et al., 2015). У мышей с пониженным уровнем экспрессии гена *PPAR γ* в жировой ткани или во всем теле наблюдается ускоренное старение (Argmann et al., 2009). При этом повышение активности белка PPAR γ у стареющих крыс приводит к ослаблению возрастного увеличения окислительного стресса и воспаления в почках (Sung et al., 2006).

Поддержание целостности генома

Существует положительная взаимосвязь между продолжительностью жизни и эффективностью репарации повреждений ДНК. Эффективность эксцизионной репарации ДНК повышается с увеличением максимальной продолжительности жизни вида у семи видов млекопитающих (Hart, Setlow, 1974). Ферментативная активность полимеразы поли-(АДФ-рибозы) 1 (PARP1), являющейся сенсором разрывов цепей ДНК, положительно коррелирует с максимальной продолжительностью жизни у 13 видов млекопитающих (Grube, Burkle, 1992). В клетках млекопитающих уровень фермента Ku80, распознающего двухцепочечные разрывы ДНК, также коррелирует с продолжительностью жизни (Lorenzini et al., 2009). Виды животных с исключительным долголетием, такие как голый землекоп – *Heterocephalus glaber*, летучая мышь – *Myotis brandtii*, гренландский кит – *Balaena mysticetus*, характеризуются особенностями в количестве копий или нуклеотидной последовательности некоторых генов репарации ДНК (Kim et al., 2011; Seim et al., 2013; Keane et al., 2015). У человека по крайней мере 25 генов репарации двухцепочечных разрывов ДНК связаны с долголетием у столетних (Han et al., 2013).

Поддержание целостности ДНК осуществляется с помощью специфических механизмов, обеспечивающих распознавание повреждений ДНК, задержку клеточного цикла в проверочных точках и устранение повреждений ДНК либо путем их восстановления (репарации), либо с помощью удаления их из цикла деления и апоптоза. Снижение активности генов, отвечающих за поддержание стабильности генома, приводит к уменьшению продолжительности жизни и стрессоустойчивости, тогда как сверхэкспрессия некоторых из них оказывает положительное влияние. Многие синдромы ускоренного старения вызваны мутациями генов, кодирующих ферменты распознавания и репарации повреждений ДНК. Например, к ним относятся синдром Вернера (связан с мутацией в гене *WRN*), пигментная ксеродерма (вызвана мутацией одного из генов пигментной ксеродермы, отвечающих за эксцизионную репарацию нуклеотидов), синдром Коккейна (мутация генов *CSA* и *CSB*), атаксия-телеангиэктазия (мутация *ATM*), синдром Секеля (мутация *ATR*), синдром хромосомных поломок Ниймеген (мутация в гене *NBS1* кофактора киназы ATM) и ряд других (Шапошников и др., 2015).

Киназы ATM и ATR являются важнейшими сенсорами двунигетных и однонигетных повреждений ДНК и обеспечивают запуск проверочных точек клеточного цикла, инициацию задержки клеточного цикла и репарацию

ДНК. Они фосфорилируют ключевые белки сигнальных каскадов при ответе на повреждение ДНК, включая p53, Chk1, Chk2, Mdm2, NSB1, AMPK (Шапошников и др., 2015). Показано, что однонуклеотидный полиморфизм *rs189037* гена *ATM* связан с долголетием людей (Piaceri et al., 2013). Введение дополнительной копии гомолога *ATR* в геном дрозофил приводило к статистически значимому увеличению продолжительности жизни (Symphorien, Woodruff, 2003).

Одной из мишеней этих киназ является транскрипционный фактор p53. Его активация необходима для реализации стресс-реакций клетки от остановки клеточного цикла и репарации ДНК до клеточной гибели (апоптоза). Важнейшей функцией p53 является подавление роста опухолей. Известно, что более чем половина раковых опухолей человека связана с нарушением работы гена *p53* (Feng et al., 2011). Более того, его нокаут у мышей сопровождается проявлением симптомов ускоренного старения, атрофией органов и остеопорозом, сниженной стрессоустойчивостью (Tuner et al., 2002). Транскрипционный фактор p53 контролирует экспрессию генов эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов, репарации мисматчей, среди которых есть и другие гены долголетия, например *GADD45*.

Семейство генов *GADD45* кодирует небольшие регуляторные белки, задействованные во многих процессах поддержания стабильности генома через межбелковые и ДНК-белковые взаимодействия (Moskalev et al., 2015). Известно, что мыши с мутацией *GADD45a* характеризуются нестабильностью генома и повышенной восприимчивостью к действию генотоксических агентов (Hollander et al., 1999). В работе на дрозофилах было показано, что мутация в гене *D-GADD45* снижает продолжительность жизни животных и приводит к нарушению у них биологических реакций на действие гамма-излучения (Moskalev et al., 2012). В то же время сверхэкспрессия гена *D-GADD45* в нервной системе дрозофил значительно увеличивает продолжительность жизни без ухудшения параметров качества жизни (Plyusnina et al., 2011). Положительные эффекты показаны и при сверхактивации других генов, обеспечивающих поддержание целостности генома, например *PARP-1* и *XPF* (Shaposhnikov et al., 2011, 2015).

В поддержании целостности генома большое значение также имеет активность теломеразы. Она представляет собой обратную транскриптазу и отвечает за синтез высокоповторной теломерной ДНК, укорачивающейся при каждом делении зрелых соматических клеток (Olovnikov, 1973). Несмотря на то что данные о корреляции длины теломер с продолжительностью жизни и скоростью старения противоречивы, установлено, что при сердечно-сосудистых заболеваниях человека обнаруживается значительное укорочение теломер в клетках эндотелия сосудов. При болезни Альцгеймера теломеры не укорачиваются, но некорректно функционируют (Voccardi et al., 2015). Повсеместная реактивация теломеразы позволяет сохранить длину неповрежденных участков теломер, что в результате должно способствовать увеличению репликативного и репаративного потенциала тканей (Lopez-Otin et al., 2013), а также способствовать поддержанию здоровья и продле-

нию жизни организма. Генотерапевтическая активация теломеразы у взрослых мышей привела к продлению жизни без увеличения частоты опухолей (Bernardes de Jesus et al., 2012) и обеспечило кардиопротекцию (Bar et al., 2014). Кроме того, теломераза участвует в регуляции внутриклеточных сигнальных путей, таких как mTOR (Ungar et al., 2011), NF-κB, COX-2 (Amsellem et al., 2011), механизмах функционирования митохондрий и ответе на оксидативный стресс (Ahmed et al., 2008).

Протеостаз

Протеостаз – совокупность механизмов, обеспечивающих контроль качества клеточных белков. Нарушение протеостаза является биомаркером старения (Chondrogianni et al., 2014) и оказывает негативное влияние на продолжительность жизни (Taylor, Dillin, 2011). Важнейший механизм поддержания протеостаза – деятельность молекулярных шаперонов, в частности белков теплового шока (HSPs), и их основного регулятора, фактора теплового шока (HSF)-1 (Åkerfelt et al., 2010). Снижение их экспрессии негативно влияет на продолжительность жизни и устойчивость к стресс-факторам, при этом происходит увеличение образования белковых агрегатов (Min et al., 2008; Moskalev et al., 2009). Сверхэкспрессия *HSF-1* или повышение количества белков теплового шока, например, таких как Hsp-16, Hsp-22, приводят к продлению жизни у различных организмов (Morrow et al., 2004; Swindell et al., 2009).

Убиквитин-протеасомная система ответственна за удаление из клетки как избыточных, так и поврежденных белков. Например, протеасомы распознают и уничтожают поврежденные белки при действии окислительного стресса. Имеются данные, указывающие на снижение активности и количества клеточной протеазы в процессе старения. Это может быть вызвано повышением уровня окислительного стресса и количества поврежденных белков, которые ингибируют активность протеасомы, и снижением экспрессии субъединиц протеасом (Carrard et al., 2002). Повышение активности убиквитин-протеасомной системы защищает клетки от протеотоксического стресса и продлевает жизнь дрожжам, нематодам и мышам (Kruegel et al., 2011; Chondrogianni et al., 2015; Pickering et al., 2015).

Аутофагия – один из основных процессов утилизации клеточных структур, связанный с их доставкой в лизосомы, где происходит их деградация (Kourtis, Tavernarakis, 2011). При активации гена *Atg8a*, связанного с аутофагией у дрозофил, предотвращается накопление связанных с возрастом повреждений в нейронах и увеличивается продолжительность жизни (Simonsen et al., 2008). У мышей при сверхэкспрессии гена *Atg5* наблюдается продление жизни, повышаются двигательная активность и чувствительность к инсулину (Puо et al., 2013). Аутофагия имеет важное значение для поддержания клеточного гомеостаза, регуляция которого нарушается при многих метаболических расстройствах, включая ожирение и резистентность к инсулину, а также в процессе старения (Rubinsztein et al., 2011).

В случае неэффективности работы систем устранения поврежденных белков в клетке могут запускаться про-

цессы, связанные с накоплением труднорастворимых белковых агрегатов, представляющих собой конечные продукты неферментативного гликозилирования (гликирования), либо возникать стресс эндоплазматической сети. Оба последствия влекут за собой запуск специфических механизмов, способных влиять на продолжительность жизни и старение организма.

В детоксикации конечных продуктов гликирования (AGEs) решающую роль играют глиоксалазная система, активность рецепторов RAGE и зависимая от RAGE активация провоспалительного транскрипционного фактора NF-κB (Fleming et al., 2011). Диета со сниженным содержанием AGEs приводит к существенному увеличению продолжительности жизни мышей, при этом наблюдается снижение уровня RAGE в тканях (Cai et al., 2007). Связывание RAGE с их лигандами AGEs может запускать сигнальные пути, способствующие старению и развитию различных возрастных патологий, в частности ожирения, диабета 2-го типа, аутоиммунных заболеваний, хронического воспаления, нейродегенеративных болезней (например болезни Альцгеймера), злокачественных новообразований (Ramasamy et al., 2016). Установлено, что у мышей с симптомами сахарного диабета и сверхэкспрессией *RAGE* усиливались процессы поражения сосудов, нефропатии и ретинопатии. С другой стороны, эти же симптомы были снижены у мышей с нокаутом гена *RAGE* (Yonekura et al., 2005). Птицы живут существенно дольше млекопитающих с сопоставимыми размерами тела, при этом у них выше температура тела и уровень глюкозы в крови, а значит, и AGEs. Это противоречие, вероятно, связано с отсутствием активных генов *RAGE* (Szwegold, Miller, 2014).

Поддержание количественного и качественного состава митохондрий

Митохондрии играют важную роль в обеспечении клеток энергией, необходимой для процессов репарации и регенерации. Ключевыми белками митохондрий, влияющими на продолжительность жизни и старение организма, являются TFAM и PGC-1α.

Транскрипционный фактор митохондрий A (TFAM) играет важную роль в поддержании целостности мтДНК. Он обеспечивает упаковку мтДНК в митохондриальные нуклеоиды, регулирует репликацию и репарацию мтДНК (Marin-Garcia, 2016). В исследованиях на крупном рогатом скоте было показано, что ген, кодирующий этот транскрипционный фактор, имеет ряд полиморфизмов (SNPs), которые могут в значительной степени определять рост, плодовитость и выживаемость животных (Clemson et al., 2011). Установлено, что у животных с возрастом происходит снижение экспрессии гена *TFAM*, а также способности его белка связываться с мтДНК (Hartmann et al., 2011; Picca et al., 2013). С другой стороны, сверхэкспрессия *TFAM* у самцов дрозофил снижала продолжительность жизни (Matsuda et al., 2013). Увеличение количества транскриптов *TFAM* также сопровождало снижение длительности жизни и усиление нейродегенерации на фоне стимуляции биогенеза митохондрий с помощью гиперактивации *CycD/Cdk4* (Icreverzi et al., 2015). При этом выключение

TFAM посредством РНК-интерференции устраняло наблюдаемые негативные эффекты (Icerverzi et al., 2015). Однако сверхэкспрессия *TFAM* повышала выживаемость у мух при обработке перекисью водорода. Это говорит о том, что несмотря на то что гиперфункция *TFAM* сокращает длительность жизни животных, она может усилить антиоксидантную активность и обеспечить защиту от окислительного стресса (Matsuda et al., 2013).

Коактиватор 1 α белка PPAR γ (PGC1 α) – основной модулятор биогенеза и работы митохондрий. Он регулирует окислительное фосфорилирование и контролирует число копий митохондриального генома (Dominy, Puigserver, 2013). PGC1 α является мишенью SIRT1 и AMPK (Jäger et al., 2007; Kanfi et al., 2008) и играет ключевую роль в увеличении продолжительности жизни при ограничении потребления калорий (Lopez-Lluch et al., 2006). Сверхэкспрессия гомолога гена *PGC1 α* в кишечнике дрозофил приводила к повышению числа митохондрий в клетках, замедлению проявления признаков старения и продлению жизни животных (Rera et al., 2011). Сверхэкспрессия *PGC1 α* в скелетной мускулатуре мышей также оказывала положительный эффект, замедляя возникновение возрастных нарушений функционирования митохондрий (Anderson, Prolla, 2009). Белок PGC1 α способствует предотвращению нежелательных изменений организма при старении в скелетной, сердечной мускулатуре и жировой ткани (Hepple et al., 2006; Anderson, Prolla, 2009).

Несмотря на то что ренин-ангиотензиновая система – известный регулятор артериального давления, связанный с развитием гипертензии и патофизиологией заболеваний сердца, сосудов и почек, основное действие системы на процессы старения связано с ее влиянием на функционирование митохондрий и клеточное дыхание (Vajareu et al., 2014). Центральным продуктом этой системы является ангиотензин II. Он участвует в регуляции иммунного ответа, воспалении, росте и делении клеток через рецепторы AT1 и AT2 (Benigni et al., 2009). При взаимодействии ангиотензина II и рецептора AT1 происходят активация NAD(P)H оксидазы и высвобождение эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS), которые повышают выработку свободных радикалов митохондриями (Vajareu et al., 2014).

Каптоприл, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (ACE), используется для лечения гипертензии. В исследованиях на нематодах было обнаружено, что он способен увеличивать продолжительность их жизни (Kumar et al., 2016). Более того, мутация в гене *acn-1*, кодирующем ортолог ACE, также оказывала положительное влияние на длительность жизни червей (Kumar et al., 2016). Фармакологическое ингибирование ACE и рецептора AT1 с помощью эналаприла и лозартана продлевает жизнь, предупреждает нарушение сердечно-сосудистой, выделительной системы, когнитивных функций и двигательной активности, метаболизма при старении у мышей и крыс с нормальным давлением (Basso et al., 2005; Santos et al., 2009). Повреждение гена, кодирующего рецептор AT1A, замедляет старение мышей через поддержание функционирования митохондрий и снижение окислительного стресса, а также активацию генов долголетия

(Benigni et al., 2009). Существуют данные, показывающие, что пролонгирующее действие блокаторов ренин-ангиотензиновой системы опосредовано подавлением сигнального пути mTOR и активацией Klotho, сиртуинов и сигнального пути витамина D (Benigni et al., 2009; de Cavanagh et al., 2015). Кроме того, описан полиморфизм *rs1799752* гена *ACE* и полиморфизм *rs275653* гена рецептора AT1, которые часто встречаются у долгожителей (Benigni et al., 2013; Kolovou et al., 2014).

Обратным действием обладает пептид ангиотензин-(1-7), который образуется в результате деятельности ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) и связывается с рецептором Mas. Известно, что контролируемое вмешательство в активность ангиотензина-(1-7) приводит к существенному увеличению длительности жизни крыс с гипертензией за счет снижения у них повреждений и подавления воспаления в головном мозге (Regenhardt et al., 2014). Инъекции рекомбинантного ACE2 также оказали положительное влияние. Они снизили окислительный стресс и нефропатию почек у мышей с симптомами сахарного диабета (Oudit et al., 2010). Нокаут *ACE2* привел к развитию кардиомиопатии и гипертензии при старении, которые связаны с усилением окислительного стресса и воспаления (Xia et al., 2011).

Воспаление

Хроническая воспалительная реакция тканей организма является одной из известных причин старения. На клеточном уровне воспалительный ответ инициируют сигнальные пути, связанные с активностью транскрипционного фактора NF- κ B (Baker et al., 2011). Этот белок принимает участие в формировании иммунитета, регуляции синтеза цитокинов, факторов роста, играет важную роль в процессе эмбриогенеза (Perkins, 2007). Активация NF- κ B инициирует экспрессию генов, участвующих в воспалении, антимикробных генов, а также повышает активность генов антиоксидантных ферментов, например супероксиддисмутазы (Liu et al., 1999). С возрастом происходит повышение активности NF- κ B, что приводит к хроническому воспалению, оксидативному стрессу и развитию возрастных заболеваний, например атеросклероза (Simmonds, Foxwell, 2008). Подавление воспалительных процессов является одним из действенных способов продления жизни. Ингибирование провоспалительных сигнальных каскадов NF- κ B генетическими и фармакологическими методами приводит к увеличению продолжительности жизни у дрозофил и мышей (Moskalev, Shaposhnikov, 2011; Zhang et al., 2013). У нематод и дрозофил наблюдается увеличение продолжительности жизни под действием противовоспалительных препаратов аспирина и ибупрофена (Ayyadevara et al., 2013; He et al., 2014). Кроме того, подавление NF- κ B предупреждало старение кожи у мышей, приводило к повышению пролиферативной активности ее клеток и уменьшению количества маркеров клеточного старения (Adler et al., 2008).

Снижение активности другого провоспалительного белка, индуцибельной синтазы окиси азота (iNOS), также оказывает положительное влияние на продолжительность жизни и старение модельных организмов. Активация

данного фермента происходит при появлении воспалительных сигналов (например, некоторых интерлейкинов или фактора некроза опухоли TNF α) (Green et al., 1994) и следует после индукции транскрипционного фактора NF- κ B. Кроме того, iNOS имеет сайты связывания с транскрипционными факторами C/EBT, CREB и STAT (Kleinert et al., 1998). Повышение уровня окиси азота, связанное с индукцией iNOS, может быть одной из причин окислительного стресса и хронического воспаления, которые в дальнейшем приводят к развитию патологий сердечно-сосудистой системы, легких, опорно-двигательного аппарата, нервной системы, а также к нарушению метаболизма и образованию рака (Ropelle et al., 2013). Интересно отметить, что на продолжительности жизни и здоровье животных негативно сказываются как повышенная активность, так и полное подавление iNOS (Tsutsui et al., 2009). Фармакологическое ингибирование iNOS снижает риск развития сердечно-сосудистых патологий у крыс, а также оказывает нейропротекторное действие (Tian et al., 2010; Broom et al., 2011).

Цитокины

Жировая ткань в настоящее время признана полноценным эндокринным органом, регулирующим энергетический гомеостаз. Адипоциты – удобная мишень для генетических манипуляций с детерминантами старения (Bluher et al., 2003). Гормоны, выделяемые жировой тканью, называют адипокинами, к ним относятся адипонектин, лептин, резистин, TNF α , IL-6, PAI-1. Эти сигнальные молекулы связаны со многими сигнальными путями клетки, определяющими старение организма. Нарушения адипокиновых сигнальных путей характерны для состояний инсулинорезистентности, гипергликемии, дислипидемии, гипертензии, а также для метаболического синдрома, которые ассоциированы со старческим фенотипом (Arai et al., 2011). У пациентов, страдающих от висцерального ожирения, снижены уровни всех перечисленных выше адипокинов, что ведет к системному воспалению, снижению чувствительности к инсулину, сердечно-сосудистым осложнениям (Garg, Agarwal, 2009). У людей возрастом свыше 100 лет была показана зависимость высокой смертности от всех причин и сниженного уровня лептина на фоне повышенного TNF α (Arai et al., 2011). Низкий уровень адипонектина в плазме крови указывает на развитие ишемической болезни сердца и может служить маркером преждевременного старения сердечно-сосудистой системы (Costacou et al., 2005).

Другим примером ассоциированных со старением цитокинов является миостатин. Миостатин – член семейства трансформирующих ростовых факторов, который подавляет рост и дифференцировку мышечной ткани (McPhetgon et al., 1997). У людей мышечная масса положительно коррелирует с продолжительностью жизни, и быстрая потеря мышечной массы во время старения часто приводит к различным заболеваниям (Miller et al., 2002). Инактивация миостатина приводит к росту мышечной массы, и этот эффект может использоваться при борьбе с различными нарушениями, такими как миопатия (Hulmi et al., 2013), рак (Gallot et al., 2014) и старение

(Mendias et al., 2015). Показано, что искусственное подавление активности миостатина у старых мышей положительно сказывается на метаболизме и физических функциях (White, LeBrasseur, 2014). Крысы с 30 % снижением циркулирующего в крови миостатина имеют увеличенную продолжительность жизни (Mendias et al., 2015).

Фактор роста GDF11 является гомологом миостатина и регулирует нейрогенез. Восстановление его уровней у стареющих мышей позволило частично восстановить функционирование скелетной мускулатуры, сосудов и нервной ткани (Katsimpardi et al., 2014; Sinha et al., 2014). Подавление его ортолога, миогланина, в мышцах дрозофил сократило жизнь плодовой мушки, увеличило частоту дефектов двигательной активности, в то время как сверхэкспрессия восстановила эти показатели (Demontis et al., 2014).

Апоптоз и селекция жизнеспособных клеток

Селекция более жизнеспособных клеток под действием умеренных стрессовых воздействий на ранних стадиях развития была предложена нами в качестве одного из возможных механизмов радиационного гормезиса (Москалев, Зайнуллин, 2003). В исследовании на дрозофиле М.М. Merino с коллегами (2015) показали, что ген *azot* участвует в элиминации ослабленных клеток, ускоряющих старение организма. Его активация способствует повышению жизнеспособности тканей, замедлению старения и увеличению продолжительности жизни. У млекопитающих также имеется ортолог гена *azot* (Merino et al., 2015).

В организме млекопитающих присутствуют и другие механизмы селекции, связанные с удалением сенесцентных клеток. Клеточное старение играет роль в ангиогенезе, заживлении кожных ран (van Deursen, 2014). Однако постепенное накопление сенесцентных клеток в тканях ускоряет старение организма. Их количество в молодом организме регулируется иммуноклиренсом, способность к которому угасает с возрастом из-за старения иммунной системы (van Deursen, 2014). Существуют экспериментальные доказательства, что искусственная элиминация сенесцентных клеток приводит к замедлению развития возрастных патологий скелетных мышц и жировой ткани (Baker et al., 2011) и увеличению продолжительности жизни животных (Baker et al., 2016).

Селекция жизнеспособных клеток тесно связана с таким механизмом, как программируемая клеточная гибель, или апоптоз. Одним из регуляторов апоптоза является сигнальный каскад Shc/Ras. У млекопитающих имеется три изоформы Shc: p52Shc, p46Shc и p66Shc, которые отвечают за подавление апоптоза, рост клеток и регуляцию продолжительности жизни (Luzi et al., 2000). Известно, что p52/p46Shc передают и усиливают сигнал от рецепторных тирозинкиназ к белкам Ras (Luzi et al., 2000). Ras представляют собой небольшие ГТФазы, которые участвуют в трансдукции сигналов от рецепторных тирозинкиназ к сигнальным путям клетки, отвечающим за метаболизм, пролиферацию, дифференциацию, апоптоз и выживание клеток (Goitre et al., 2014). К таким путям относится сигнальный каскад митоген-активируемых

киназ (МАРК) и киназ, регулирующих передачу в клетку внеклеточных сигналов (ERK) (Goitre et al., 2014). Гиперактивация и трансформация генов семейства *Ras* является причиной развития трети злокачественных опухолей, которые сложно поддаются противораковой терапии (Goitre et al., 2014). В исследованиях на дрожжах показано, что мутации, снижающие активность *Ras/Cyrl/РКА* сигнального пути, увеличивают хронологическую продолжительность жизни и устойчивость к окислительному стрессу и гипертермии за счет активации транскрипционных факторов *Msn2* и *Msn4*, а также митохондриальной супероксиддисмутазы *SOD2* (Longo, 2003). Подавление *Ras* приводит к статистически значимому увеличению продолжительности жизни дрозофил. При этом блокировка *Ras* опосредует дезактивацию инсулинового/*IGF-1* сигнального пути, приводя к ингибированию киназы *ERK* и изменению активности регуляторов транскрипции *ETS* (Slack et al., 2015).

Циркадные ритмы

Циркадные ритмы – генетически детерминированные периодические околосуточные находящиеся в зависимости от фоторежима колебания различных физиологических показателей, инициируемые строго иерархичной системой молекулярных осцилляторов, основанной на функционировании транскрипционно-трансляционных, либо трансляционно-трансляционных петель обратной связи. Гены циркадных ритмов и их продукты задействованы во множестве молекулярных процессов, сопряженных со старением организма, в том числе в патогенезе возрастных патологий (Solovyev et al., 2016).

При нормальном старении отмечаются нарушения циклов сна и бодрствования, сон становится деконсолированным, в свою очередь, осцилляции экспрессии генов циркадных ритмов теряют робастность, экспрессия изменяет амплитуду или фазу, утрачивает способность к колебаниям (Katewa et al., 2016). Отмечается, что долгоживущие виды с пренебрежимым типом старения организма не обнаруживают изменений в паттернах экспрессии генов циркадных ритмов (Solovyev et al., 2016).

Манипуляции с генами циркадных ритмов на различных моделях приводят к изменению продолжительности жизни. Мутанты *BMAL1* и особи с его нокаутом имеют сниженную продолжительность жизни (Kondratov et al., 2006). Белок *BMAL1* влияет на скорость старения, взаимодействуя с компонентами сигнального каскада *mTOR* (Khargre et al., 2014). *CLOCK* активирует провоспалительный фактор *NF-κB*, сокращающий продолжительность жизни. Ген *Timeless* дрозофилы существенно продлевает жизнь на фоне увеличенной калорийности питания (Katewa et al., 2016). Сверхэкспрессированный *Cryptochrome*, по данным К. Rakshit и J.M. Giebultowicz (2013), также продлевает жизнь дрозофилы, наряду со сверхэкспрессией *per*, являющегося естественным нейропротектором, экспрессия которого коррелирует с концентрацией мощного антиоксиданта – глутатиона (Klichko et al., 2015). Недавно стало известно, что *Per* специфично субстрату синхронизирует цикл активности дыхательных цепей с фоторежимом, в значительной степени определяя

соотношение прихода и расхода энергии, а также контролируя суточные потоки нутриентов в митохондриях, что, без сомнения, не может не сказываться на продолжительности жизни и стрессоустойчивости (Neufeld-Cohen et al., 2016).

Таким образом, на основании выполненного анализа генетических механизмов старения и долголетия можно выделить наиболее перспективные направления будущих разработок для замедления процессов старения:

- восстановление гетерохроматина, подавление ретро-транспозиций, устранение анеуплоидии;
- восстановление кислотности лизосом;
- удлинение теломер;
- подавление хронического воспаления;
- устранение перекрестных сшивок белков;
- элиминация сенесцентных клеток;
- восстановление уровней НАД⁺;
- ингибирование *mTOR*, *S6K*, *TGF-β*, *AT1*;
- контролируемая активация генов «программы долгожительства» *FOXO*, *AMPK*, *PGC1α*, *NRF2*.

Благодарности

Работа поддержана грантом Президиума РАН № 15-4-4-23.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Москалев А.А. Старение и гены. СПб.: Наука, 2008.
- Москалев А.А., Зайнуллин В.Г. Роль геаррег-зависимого апоптоза в радиационно-индуцированном изменении продолжительности жизни у *Drosophila melanogaster*. Радиационная биология. Радиоэкология. 2003;43(2):242-244.
- Шапошников М.В., Прошкина Е.Н., Шилова Л.А., Москалев А.А. Роль репарации повреждений ДНК в долголетию. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2015.
- Adler A.S., Kawahara T.L., Segal E., Chang H.Y. Reversal of aging by *NFκB* blockade. *Cell Cycle*. 2008;7(5):556-559.
- Ahmed S., Passos J.F., Birket M.J., Beckmann T., Brings S., Peters H., Birch-Machin M.A., von Zglinicki T., Saretzki G. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J. Cell Sci*. 2008;121(Pt 7):1046-1053. DOI 10.1242/jcs.019372.
- Åkerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010;11(8):545-555.
- Amsellem V., Gary-Bobo G., Marcos E., Maitre B., Chaar V., Validire P., Stern J.B., Noureddine H., Sapin E., Rideau D., Hue S., Le Corvoisier P., Le Gouvello S., Dubois-Randé J.L., Boczkowski J., Adnot S. Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Crit. Care*. 2011; 184(12):1358-1366. DOI 10.1164/rccm.201105-0802OC.
- Anderson R., Prolla T. *PGC-1α* in aging and anti-aging interventions. *BBA-Gen. Subjects*. 2009;1790(10):1059-1066.
- Anisimov V.N., Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2013;87(3):201-223. DOI 10.1016/j.critrevonc.2013.01.005.
- Arai Y., Takayama M., Abe Y., Hirose N. Adipokines and aging. *J. Atheroscler. Thromb*. 2011;18(7):545-550.
- Argmann C., Dobrin R., Heikkinen S., Auburtin A., Pouilly L., Cock T.-A., Koutnikova H., Zhu J., Schadt E.E., Auwerx J. *Pparγ2* is a key driver of longevity in the mouse. *PLoS Genet*. 2009;5(12): e1000752.

- Argon Y., Gidalevitz T. Candidate Genes That Affect Aging Through Protein Homeostasis Longevity Genes. New York: Springer, 2015: 45-72.
- Aschner Y., Downey G.P. Transforming growth factor-beta: master regulator of the respiratory system in health and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2016. DOI 10.1165/rmb.2015-0391TR.
- Ayyadevara S., Bharill P., Dandapat A., Hu C., Khaidakov M., Mitra S., Shmookler Reis R.J., Mehta J.L. Aspirin inhibits oxidant stress, reduces age-associated functional declines, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxid. Redox. Sign.* 2013;18(5):481-490. DOI 10.1089/ars.2011.4151.
- Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J., Zhong J., Saltness R.A., Jeganathan K.B., Verzosa G.C., Pezeshki A., Khazaie K., Miller J.D., van Deursen J.M. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016; 530(7589):184-189. DOI 10.1038/nature16932.
- Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., LeBrasseur N.K., Childs B.G., van de Sluis B., Kirkland J.L., van Deursen J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232-236. DOI 10.1038/nature10600.
- Bar C., Bernardes de Jesus B., Serrano R., Tejera A., Ayuso E., Jimenez V., Formentini I., Bobadilla M., Mizrahi J., de Martino A., Gomez G., Pisano D., Mulero F., Wollert K.C., Bosch F., Blasco M.A. Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction. *Nat. Commun.* 2014;5:5863. DOI 10.1038/ncomms6863.
- Basso N., Paglia N., Stella I., de Cavanagh E.M., Ferder L., del Rosario Lores Arnaiz M., Inserra F. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regul. Peptides*. 2005; 128(3):247-252. DOI 10.1016/j.regpep.2004.12.027.
- Benigni A., Corna D., Zoja C., Sonzogni A., Latini R., Salio M., Conti S., Rottoli D., Longaretti L., Cassis P., Morigi M., Coffman T.M., Remuzzi G. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J. Clin. Invest.* 2009;119(3):524-530. DOI 10.1172/JCI36703.
- Benigni A., Orisio S., Noris M., Iatropoulos P., Castaldi D., Kamide K., Rakugi H., Arai Y., Todeschini M., Ogliairi G., Imai E., Gondo Y., Hirose N., Mari D., Remuzzi G. Variations of the angiotensin II type 1 receptor gene are associated with extreme human longevity. *Age (Dordr)*. 2013;35(3):993-1005. DOI 10.1007/s11357-012-9408-8.
- Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., Tejera A.M., Ayuso E., Bosch F., Blasco M.A. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol. Med.* 2012;4(8):691-704. DOI 10.1002/emmm.201200245.
- Bian A., Neyra J.A., Zhan M., Hu M.C. Klotho, stem cells, and aging. *Clin. Interv. Aging*. 2015;10:1233.
- Biteau B., Karpac J., Hwangbo D., Jasper H. Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp. Gerontol.* 2011;46(5):349-354. DOI 10.1016/j.exger.2010.11.003.
- Biteau B., Karpac J., Supoyo S., Degennaro M., Lehmann R., Jasper H. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2010;6(10):e1001159. DOI 10.1371/journal.pgen.1001159.
- Bitto A., Wang A.M., Bennett C.F., Kaeberlein M. Biochemical genetic pathways that modulate aging in multiple species. *Cold Spring Harb. Persp. Med.* 2015;5(11). DOI 10.1101/cshperspect.a025114.
- Bluhner M., Kahn B.B., Kahn C.R. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*. 2003;299(5606):572-574. DOI 10.1126/science.1078223.
- Boccardi V., Pelini L., Ercolani S., Ruggiero C., Mecocci P. From cellular senescence to Alzheimer's disease: The role of telomere shortening. *Ageing Res. Rev.* 2015;22:1-8. DOI 10.1016/j.arr.2015.04.003.
- Brooks C.L., Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat. Rev. Cancer*. 2009;9(2):123-128.
- Broom L., Marinova-Mutafchieva L., Sadeghian M., Davis J.B., Medhurst A.D., Dexter D.T. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;50(5):633-640. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.026.
- Budanov A.V., Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008;134(3):451-460. DOI 10.1016/j.cell.2008.06.028.
- Cai W., He J.C., Zhu L., Chen X., Wallenstein S., Striker G.E., Vlasara H. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. *Am. J. Pathol.* 2007;170(6):1893-1902. DOI 10.2353/ajpath.2007.061281.
- Cantó C., Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology*. 2011;26(4):214-224.
- Carrard G., Bulteau A.-L., Petropoulos I., Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002;34(11):1461-1474.
- Carrieri G., Marzi E., Olivieri F., Marchegiani F., Cavallone L., Cardelli M., Giovagnetti S., Stecconi R., Molendini C., Trapassi C., De Benedictis G., Kleetsas D., Franceschi C. The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. *Ageing Cell*. 2004;3(6):443-448. DOI 10.1111/j.1474-9728.2004.00129.x.
- Cha D.R., Han J.Y., Su D.M., Zhang Y., Fan X., Breyer M.D., Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha deficiency protects aged mice from insulin resistance induced by high-fat diet. *Am. J. Nephrol.* 2007;27(5):479-482.
- Cha Y.I., Kim H.-S. Emerging role of sirtuins on tumorigenesis: possible link between aging and cancer. *BMB Reports*. 2013;46(9): 429-438.
- Chang H.C., Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrin. Met.* 2014;25(3):138-145. DOI 10.1016/j.tem.2013.12.001.
- Chen D., Guarente L. SIRT2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol. Med.* 2007;13(2):64-71.
- Chen H., Zheng X., Zheng Y. Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia. *Cell*. 2014;159(4): 829-843.
- Cheong J.K., Zhang F., Chua P.J., Bay B.H., Thorburn A., Virshup D.M. Casein kinase 1alpha-dependent feedback loop controls autophagy in RAS-driven cancers. *J. Clin. Invest.* 2015;125(4):1401-1418. DOI 10.1172/JCI78018.
- Chondrogianni N., Georgila K., Kourtis N., Tavernarakis N., Gonos E.S. 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB J.* 2015;29(2):611-622.
- Chondrogianni N., Petropoulos I., Grimm S., Georgila K., Catalgol B., Friguet B., Grune T., Gonos E.S. Protein damage, repair and proteolysis. *Mol. Aspects Med.* 2014;35:1-71.
- Clempson A.M., Pollott G.E., Brickell J.S., Bourne N.E., Munce N., Wathes D.C. Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. *Animal*. 2011;5(9):1335-1343. DOI 10.1017/S1751731111000346.
- Codd V., Nelson C.P., Albrecht E., Mangino M., Deelen J., Buxton J.L., Hottenga J.J., Fischer K., Esko T., Surakka I. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat. Genet.* 2013;45(4):422-427.
- Cohen H.Y., Miller C., Bitterman K.J., Wall N.R., Hekking B., Kessler B., Howitz K.T., Gorospe M., de Cabo R., Sinclair D.A. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004;305(5682):390-392.
- Corpet A., Stucki M. Chromatin maintenance and dynamics in senescence: a spotlight on SAHF formation and the epigenome of senescent cells. *Chromosoma*. 2014;123(5):423-436. DOI 10.1007/s00412-014-0469-6.
- Costacou T., Zgibor J.C., Evans R.W., Otvos J., Lopes-Virella M.F., Tracy R.P., Orchard T.J. The prospective association between adi-

- ponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The pittsburgh epidemiology of diabetes complications study. *Diabetologia*. 2005;48(1):41-48. DOI 10.1007/s00125-004-1597-y.
- de Cavanagh E.M., Inserra F., Ferder L. Angiotensin II blockade: how its molecular targets may signal to mitochondria and slow aging. Coincidences with calorie restriction and mTOR inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015;309(1):H15-H44. DOI 10.1152/ajpheart.00459.2014.
- Demontis F., Patel V.K., Swindell W.R., Perrimon N. Intertissue control of the nucleolus via a myokine-dependent longevity pathway. *Cell Rep.* 2014;7(5):1481-1494. DOI 10.1016/j.celrep.2014.05.001.
- Demontis F., Perrimon N. FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*. 2010;143(5):813-825. DOI 10.1016/j.cell.2010.10.007.
- Dermaku-Sopjani M., Kolgeci S., Abazi S., Sopjani M. Significance of the anti-aging protein Klotho. *Mol. Memb. Biol.* 2013;30(8):369-385.
- Ding J., Sackmann-Sala L., Kopchick J.J. Mouse models of growth hormone action and aging: a proteomic perspective. *Proteomics*. 2013;13(3-4):674-685. DOI 10.1002/pmic.201200271.
- Dominy J.E., Puigserver P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb. Persp. Biol.* 2013;5(7):a015008.
- Efeyan A., Zoncu R., Sabatini D.M. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol. Med.* 2012;18(9):524-533. DOI 10.1016/j.molmed.2012.05.007.
- Fang E.F., Scheibye-Knudsen M., Chua K.F., Mattson M.P., Croteau D.L., Bohr V.A. Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. DOI 10.1038/nrm.2016.14.
- Feng Z., Lin M., Wu R. The regulation of aging and longevity: a new and complex role of p53. *Genes. Cancer*. 2011;2(4):443-452. DOI 10.1177/1947601911410223.
- Fleming T.H., Humpert P.M., Nawroth P.P., Bierhaus A. Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review. *Gerontology*. 2011;57(5):435-443. DOI 10.1159/000322087.
- Frippiat C., Dewelle J., Remaclé J., Toussaint O. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33(10):1334-1346.
- Gallot Y.S., Durieux A.-C., Castells J., Desgeorges M.M., Vernus B., Plantureux L., Rémond D., Jahnke V.E., Lefai E., Dardevet D. Myostatin gene inactivation prevents skeletal muscle wasting in cancer. *Cancer Res.* 2014;74(24):7344-7356.
- Garcia-Martinez J.M., Alessi D.R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 2008;416(3):375-385. DOI 10.1042/BJ20081668.
- Garg A., Agarwal A.K. Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. *Biochem. Biophys. Acta.* 2009;1791(6):507-513. DOI 10.1016/j.bbali.2008.12.014.
- Genabai N.K., Ahmad S., Zhang Z., Jiang X., Gabaldon C.A., Gangwani L. Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(24):6986-7004. DOI 10.1093/hmg/ddv401.
- Goetz R., Ohnishi M., Ding X., Kurosu H., Wang L., Akiyoshi J., Ma J., Gai W., Sidis Y., Pitteloud N., Kuro O.M., Razaque M.S., Mohammadi M. Klotho coreceptors inhibit signaling by paracrine fibroblast growth factor 8 subfamily ligands. *Mol. Cell Biol.* 2012;32(10):1944-1954. DOI 10.1128/MCB.06603-11.
- Goitre L., Trapani E., Trabalzini L., Retta S.F. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods Mol. Biol.* 2014;1120:1-18. DOI 10.1007/978-1-62703-791-4_1.
- Green S.J., Scheller L.F., Marletta M.A., Seguin M.C., Klotz F.W., Slayter M., Nelson B.J., Nacy C.A. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* 1994;43(1-2):87-94.
- Grube K., Burkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992;89(24):11759-11763.
- Han J., Ryu S., Moskowitz D.M., Rothenberg D., Leahy D.J., Atzmon G., Barzilai N., Suh Y. Discovery of novel non-synonymous SNP variants in 988 candidate genes from 6 centenarians by target capture and next-generation sequencing. *Mech. Ageing Dev.* 2013;134(10):478-485. DOI 10.1016/j.mad.2013.01.005.
- Hannon G.J., Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994;371(6494):257-261. DOI 10.1038/371257a0.
- Hannum G., Guinney J., Zhao L., Zhang L., Hughes G., Sadda S., Klotzle B., Bibikova M., Fan J.-B., Gao Y. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol. Cell*. 2013;49(2):359-367.
- Harshman L.G., Moore K.M., Sty M.A., Magwire M.M. Stress resistance and longevity in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol. Aging*. 1999;20(5):521-529.
- Hart R.W., Setlow R.B. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1974;71(6):2169-2173.
- Hartmann N., Reichwald K., Wittig I., Drose S., Schmeisser S., Luck C., Hahn C., Graf M., Gausmann U., Terzibas E., Cellierino A., Ristow M., Brandt U., Platzer M., Englert C. Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*. 2011;10(5):824-831. DOI 10.1111/j.1474-9726.2011.00723.x.
- He C., Tsuchiyama S.K., Nguyen Q.T., Plyusnina E.N., Terrill S.R., Sahibzada S., Patel B., Faulkner A.R., Shaposhnikov M.V., Tian R., Tsuchiya M., Kaerberlein M., Moskalev A.A., Kennedy B.K., Polymeris M. Enhanced longevity by ibuprofen, conserved in multiple species, occurs in yeast through inhibition of tryptophan import. *PLoS Genet.* 2014;10(12):e1004860. DOI 10.1371/journal.pgen.1004860.
- Hepple R.T., Baker D.J., McConkey M., Murynka T., Norris R. Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. *Rejuven. Res.* 2006;9(2):219-222.
- Herranz D., Munoz-Martin M., Canamero M., Mulero F., Martinez-Pastor B., Fernandez-Capetillo O., Serrano M. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* 2010;1:3. DOI 10.1038/ncomms1001.
- Herskovits A.Z., Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron*. 2014;81(3):471-483. DOI 10.1016/j.neuron.2014.01.028.
- Hollander M.C., Sheikh M.S., Bulavin D.V., Lundgren K., Augeri-Henmueller L., Shehee R., Molinaro T.A., Kim K.E., Tolosa E., Ashwell J.D., Rosenberg M.P., Zhan Q., Fernandez-Salguero P.M., Morgan W.F., Deng C.X., Fornace A.J., Jr. Genomic instability in *Gadd45a*-deficient mice. *Nat. Genet.* 1999;23(2):176-184. DOI 10.1038/13802.
- Hsu A.L., Murphy C.T., Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*. 2003;300(5622):1142-1145. DOI 10.1126/science.1083701.
- Hu M.C., Shi M., Zhang J., Pastor J., Nakatani T., Lanske B., Razaque M.S., Rosenblatt K.P., Baum M.G., Kuro-o M. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *The FASEB J.* 2010;24(9):3438-3450.
- Hulmi J.J., Oliveira B.M., Silvennoinen M., Hoogaars W.M., Pastermack A., Kainulainen H., Ritvos O. Exercise restores decreased physical activity levels and increases markers of autophagy and oxidative capacity in myostatin/activin-blocked mdx mice. *Am. J. Physiol. Endoc. Metab.* 2013;305(2):E171-E182.
- Icreverzi A., de la Cruz A.F., Walker D.W., Edgar B.A. Changes in neuronal CycD/Cdk4 activity affect aging, neurodegeneration, and oxidative stress. *Aging Cell*. 2015;14(5):896-906. DOI 10.1111/acel.12376.


- Jäger S., Handschin C., Pierre J., Spiegelman B.M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl Acad. Sci.* 2007;104(29):12017-12022.
- Jazwinski S.M., Yashin A.I. Aging and health – a systems biology perspective. *Introduction. Interdiscip. Top Gerontol.* 2015;40:VII-XII.
- Jewell J.L., Russell R.C., Guan K.L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(3):133-139. DOI 10.1038/nrm3522.
- Junnilla R.K., List E.O., Berryman D.E., Murrey J.W., Kopchick J.J. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013;9(6):366-376. DOI 10.1038/nrendo.2013.67.
- Kanfi Y., Naiman S., Amir G., Peshti V., Zinman G., Nahum L., Bar-Joseph Z., Cohen H.Y. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 2012;483(7388):218-221. DOI 10.1038/nature10815.
- Kanfi Y., Peshti V., Gozlan Y.M., Rathaus M., Gil R., Cohen H.Y. Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* 2008;582(16):2417-2423. DOI 10.1016/j.febslet.2008.06.005.
- Katewa S.D., Akagi K., Bose N., Rakshit K., Camarella T., Zheng X., Hall D., Davis S., Nelson C.S., Brem R.B., Ramanathan A., Sehgal A., Giebultowicz J.M., Kapahi P. Peripheral circadian clocks mediate dietary restriction-dependent changes in lifespan and fat metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab.* 2016;23(1):143-154. DOI 10.1016/j.cmet.2015.10.014.
- Katsimpardi L., Litterman N.K., Schein P.A., Miller C.M., Loffredo F.S., Wojtkiewicz G.R., Chen J.W., Lee R.T., Wagers A.J., Rubin L.L. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science.* 2014;344(6184):630-634. DOI 10.1126/science.1251141.
- Keane M., Semeiks J., Webb A.E., Li Y.I., Quesada V., Craig T., Madsen L.B., van Dam S., Brawand D., Marques P.I., Michalak P., Kang L., Bhak J., Yim H.S., Grishin N.V., Nielsen N.H., Heide-Jorgensen M.P., Oziolor E.M., Matson C.W., Church G.M., Stuart G.W., Patton J.C., George J.C., Suydam R., Larsen K., Lopez-Otin C., O'Connell M.J., Bickham J.W., Thomsen B., de Magalhães J.P. Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome. *Cell Rep.* 2015;10(1):112-122. DOI 10.1016/j.celrep.2014.12.008.
- Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 1993;366(6454):461-464. DOI 10.1038/366461a0.
- Khan M.H., Ligon M., Hussey L.R., Hufnal B., Farber R. 2nd., Munkácsy E., Rodriguez A., Dillow A., Kahlig E., Rea S.L. TAF-4 is required for the life extension of *isp-1*, *clk-1* and *tpk-1* Mit mutants. *Aging (Albany NY).* 2013;5(10):741-758.
- Khapre R.V., Kondratova A.A., Patel S., Dubrovsky Y., Wrobel M., Antoch M.P., Kondratov R.V. BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging. *Aging (Albany NY).* 2014;6(1):48-57.
- Kim E.B., Fang X., Fushan A.A., Huang Z., Lobanov A.V., Han L., Marino S.M., Sun X., Turanov A.A., Yang P., Yim S.H., Zhao X., Kasaikina M.V., Stoltzki N., Peng C., Polak P., Xiong Z., Kiezun A., Zhu Y., Chen Y., Kryukov G.V., Zhang Q., Peshkin L., Yang L., Bronson R.T., Buffenstein R., Wang B., Han C., Li Q., Chen L., Zhao W., Sunyaev S.R., Park T.J., Zhang G., Wang J., Gladyshev V.N. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature.* 2011;479(7372):223-227. DOI 10.1038/nature10533.
- Kleinert H., Wallerath T., Fritz G., Ihrig-Biedert I., Rodriguez-Pascual F., Geller D.A., Forstermann U. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 1998;125(1):193-201. DOI 10.1038/sj.bjp.0702039.
- Klichko V.I., Chow E.S., Kotwica-Rolinska J., Orr W.C., Giebultowicz J.M., Radyuk S.N. Aging alters circadian regulation of redox in *Drosophila*. *Front. Genet.* 2015;6:83. DOI 10.3389/fgene.2015.00083.
- Kolovou G., Kolovou V., Vasiliadis I., Giannakopoulou V., Mihas G., Bilianou H., Kollia A., Papadopoulou E., Marvaki A., Goumas G., Kalogeropoulos P., Limperi S., Katsiki N., Mavrogeni S. The frequency of 4 common gene polymorphisms in nonagenarians, centenarians, and average life span individuals. *Angiology.* 2014;65(3):210-215. DOI 10.1177/0003319712475075.
- Kondratov R.V., Kondratova A.A., Gorbacheva V.Y., Vykhoanets O.V., Antoch M.P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes. Dev.* 2006;20(14):1868-1873. DOI 10.1101/gad.1432206.
- Kourtis N., Tavernarakis N. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *EMBO J.* 2011;30(13):2520-2531.
- Kruegel U., Robison B., Dange T., Kahlert G., Delaney J.R., Kotiredy S., Tsuchiya M., Tsuchiyama S., Murakami C.J., Schleit J. Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2011;7(9):e1002253.
- Kumar S., Dietrich N., Kornfeld K. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor extends *Caenorhabditis elegans* Life Span. *PLoS Genet.* 2016;12(2):e1005866. DOI 10.1371/journal.pgen.1005866.
- Le Bourg E. The somatotrophic axis may not modulate ageing and longevity in humans. *Biogerontology.* 2016;17(2):421-429. DOI 10.1007/s10522-015-9632-6.
- Lee S.-J., Hwang A.B., Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr. Biol.* 2010a;20(23):2131-2136.
- Lee Y.H., Lee H.Y., Kim T.G., Lee N.H., Yu M.K., Yi H.K. PPARgamma maintains homeostasis through autophagy regulation in dental pulp. *J. Dent. Res.* 2015;94(5):729-737. DOI 10.1177/0022034515573833.
- Lee Y.H., Lee N.H., Bhattarai G., Yun J.S., Kim T.I., Jhee E.C., Yi H.K. PPAR γ inhibits inflammatory reaction in oxidative stress induced human diploid fibroblast. *Cell Biochem. Funct.* 2010b;28(6):490-496.
- Leiser S.F., Kaerberlein M. The hypoxia-inducible factor HIF-1 functions as both a positive and negative modulator of aging. *Biol. Chem.* 2010;391(10):1131-1137.
- Lewis K.N., Mele J., Hornsby P.J., Buffenstein R. Stress resistance in the naked mole-rat: the bare essentials – a mini-review. *Gerontology.* 2012;58(5):453-462. DOI 10.1159/000335966.
- Lewis K.N., Wason E., Edrey Y.H., Kristan D.M., Nevo E., Buffenstein R. Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015;112(12):3722-3727. DOI 10.1073/pnas.1417566112.
- Liu S.F., Ye X., Malik A.B. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *In vivo* expression of proinflammatory genes. *Circulation.* 1999;100(12):1330-1337.
- Longo V.D. The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity. *Exp. Gerontol.* 2003;38(7):807-811.
- Lopez-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmer S., Cascajo M., Allard J., Ingram D., Navas P. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006;103(6):1768-1773.
- Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-1217. DOI 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Lorenzini A., Johnson F.B., Oliver A., Tresini M., Smith J.S., Hdeib M., Sell C., Cristofalo V.J., Stamato T.D. Significant correlation of species longevity with DNA double strand break recognition but not with telomere length. *Mech. Ageing Dev.* 2009;130(11-12):784-792. DOI 10.1016/j.mad.2009.10.004.
- Luo S., Shaw W.M., Ashraf J., Murphy C.T. TGF-beta Sma/Mab signaling mutations uncouple reproductive aging from somatic aging. *PLoS Genet.* 2009;5(12):e1000789. DOI 10.1371/journal.pgen.1000789.
- Luzi L., Confalonieri S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G. Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000;10(6):668-674.
- Manya H., Akasaka-Manya K., Endo T. Klotho protein deficiency and aging. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2010;10(s1):S80-S87.

- Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*. 2011;332(6036):1443-1446. DOI 10.1126/science.1202723.
- Marin-Garcia J. Mitochondrial DNA repair: a novel therapeutic target for heart failure. *Heart Fail Rev*. 2016. DOI 10.1007/s10741-016-9543-x.
- Martin-Montalvo A., Villalba J.M., Navas P., De Cabo R. NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene*. 2011;30(5):505-520.
- Maslov A.Y., Ganapathi S., Westerhof M., Quispe-Tintaya W., White R.R., Van Houten B., Reiling E., Dollé M.E., Steeg H., Hasty P. DNA damage in normally and prematurely aged mice. *Aging Cell*. 2013;12(3):467-477.
- Masternak M.M., Bartke A. PPARs in calorie restricted and genetically long-lived mice. *PPAR Res*. 2006;2007.
- Matsuda T., Kanki T., Tanimura T., Kang D., Matsuura E.T. Effects of overexpression of mitochondrial transcription factor A on lifespan and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Bioph. Res. Commun*. 2013;430(2):717-721. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.11.084.
- McPherron A., Lawler A., Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 1997;5(1):83-90.
- Mendias C.L., Bakhurin K.I., Gumucio J.P., Shallal-Ayzin M.V., Davis C.S., Faulkner J.A. Haploinsufficiency of myostatin protects against aging-related declines in muscle function and enhances the longevity of mice. *Aging Cell*. 2015;14(4):704-706.
- Merino M.M., Rhiner C., Lopez-Gay J.M., Buechel D., Hauert B., Moreno E. Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell*. 2015;160(3):461-476. DOI 10.1016/j.cell.2014.12.017.
- Miller M.D., Crotty M., Giles L.C., Bannerman E., Whitehead C., Cobiac L., Daniels L.A., Andrews G. Corrected arm muscle area: an independent predictor of long-term mortality in community-dwelling older adults? *J. Am. Geriatr. Soc*. 2002;50(7):1272-1277.
- Min J.-N., Whaley R.A., Sharpless N.E., Lockyer P., Portbury A.L., Patterson C. CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol. Cell. Biol*. 2008;28(12):4018-4025.
- Morrow G., Samson M., Michaud S., Tanguay R.M. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *The FASEB J*. 2004;18(3):598-599.
- Moskalev A.A., Aliper A.M., Smit-McBride Z., Buzdin A., Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle*. 2014;13(7):1063-1077. DOI 10.4161/cc.28433.
- Moskalev A., Plyusnina E., Shaposhnikov M., Shilova L., Kazachenok A., Zhavoronkov A. The role of *D-GADD45* in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance. *Cell Cycle*. 2012;11(22):4222-4241. DOI 10.4161/cc.22545.
- Moskalev A.A., Proshkina E.N., Shaposhnikov M.V. Chapter 2. Gadd45 Proteins in Aging and Longevity of Mammals and *Drosophila*. *Life Extension Lessons from Drosophila*. Cham: Springer, 2015:39-65.
- Moskalev A., Shaposhnikov M. Pharmacological inhibition of NF- κ B prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(4):391-394.
- Moskalev A., Shaposhnikov M., Turysheva E. Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of *Hsp* and *Hsps*. *Biogerontology*. 2009;10(1):3-11. DOI 10.1007/s10522-008-9147-5.
- Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M., Mills K.D., Patel P., Hsu J.T., Hong A.L., Ford E., Cheng H.L., Kennedy C., Nunez N., Bronson R., Frendewey D., Auerbach W., Valenzuela D., Karow M., Hottiger M.O., Hursting S., Barrett J.C., Guarente L., Mulligan R., Demple B., Yancopoulos G.D., Alt F.W. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-329. DOI 10.1016/j.cell.2005.11.044.
- Neufeld-Cohen A., Robles M.S., Aviram R., Manella G., Adamovich Y., Ladeux B., Nir D., Rousso-Noori L., Kuperman Y., Golik M., Mann M., Asher G. Circadian control of oscillations in mitochondrial rate-limiting enzymes and nutrient utilization by PERIOD proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016;113(12):E1673-E1682. DOI 10.1073/pnas.1519650113.
- Oh S.W., Mukhopadhyay A., Svrzikapa N., Jiang F., Davis R.J., Tissenbaum H.A. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005;102(12):4494-4499. DOI 10.1073/pnas.0500749102.
- Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol*. 1973;41(1):181-190.
- Onken B., Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8758.
- Oudit G.Y., Liu G.C., Zhong J., Basu R., Chow F.L., Zhou J., Loibner H., Janzek E., Schuster M., Penninger J.M., Herzenberg A.M., Kassiri Z., Scholey J.W. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(2):529-538. DOI 10.2337/db09-1218.
- Pall M.L., Levine S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Sheng Li Xue Bao*. 2015;67(1):1-18.
- Perkins N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007;8(1):49-62. DOI 10.1038/nrm2083.
- Piaceri I., Bagnoli S., Tedde A., Sorbi S., Nacmias B. Ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*) genetic variant in Italian centenarians. *Neurol. Sci*. 2013;34(4):573-575. DOI 10.1007/s10072-012-1188-5.
- Picca V., Pesce V., Fracasso F., Joseph A.M., Leeuwenburgh C., Lezza A.M. Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial DNA replication in rat liver. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74644. DOI 10.1371/journal.pone.0074644.
- Pickering A.M., Lehr M., Miller R.A. Lifespan of mice and primates correlates with immunoproteasome expression. *J. Clin. Invest*. 2015;125(5):2059-2068.
- Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to *D-GADD45* overexpression in the nervous system. *Biogerontology*. 2011;12(3):211-226. DOI 10.1007/s10522-010-9311-6.
- Pyo J.-O., Yoo S.-M., Ahn H.-H., Nah J., Hong S.-H., Kam T.-I., Jung S., Jung Y.-K. Overexpression of *Atg5* in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat. Commun*. 2013;4.
- Rakshit K., Giebultowicz J.M. Cryptochrome restores dampened circadian rhythms and promotes healthspan in aging *Drosophila*. *Aging Cell*. 2013;12(5):752-762. DOI 10.1111/ace1.12100.
- Ramasamy R., Shekhtman A., Schmidt A.M. The multiple faces of RAGE – opportunities for therapeutic intervention in aging and chronic disease. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2016;20(4):431-446. DOI 10.1517/14728222.2016.1111873.
- Regenhardt R.W., Mecca A.P., Desland F., Ritucci-Chinni P.F., Ludin J.A., Greenstein D., Banuelos C., Bizon J.L., Reinhard M.K., Summers C. Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp. Physiol*. 2014;99(2):442-453. DOI 10.1113/expphysiol.2013.075242.
- Rera M., Bahadorani S., Cho J., Koehler C.L., Ulgherait M., Hur J.H., Ansari W.S., Lo T., Jr., Jones D.L., Walker D.W. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab*. 2011;14(5):623-634. DOI 10.1016/j.cmet.2011.09.013.
- Ropelle E.R., Pauli J.R., Cintra D.E., da Silva A.S., De Souza C.T., Guadagnini D., Carvalho B.M., Caricilli A.M., Katashima C.K., Carvalho-Filho M.A., Hirabara S., Curi R., Velloso L.A., Saad M.J., Carnevali J.B. Targeted disruption of inducible nitric oxide syn-

- these protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes*. 2013;62(2):466-470. DOI 10.2337/db12-0339.
- Rubinsztein D.C., Mariño G., Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-695.
- Salminen A., Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res. Rev.* 2012;11(2):230-241. DOI 10.1016/j.arr.2011.12.005.
- Santos E.L., de Picoli Souza K., da Silva E.D., Batista E.C., Martins P.J., D'Almeida V., Pesquero J.B. Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochem. Pharmacol.* 2009;78(8):951-958. DOI 10.1016/j.bcp.2009.06.018.
- Satoh A., Brace C.S., Rensing N., Cliften P., Wozniak D.F., Herzog E.D., Yamada K.A., Imai S. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.* 2013;18(3):416-430.
- Seim I., Fang X., Xiong Z., Lobanov A.V., Huang Z., Ma S., Feng Y., Turanov A.A., Zhu Y., Lenz T.L., Geraschenko M.V., Fan D., Hee Yim S., Yao X., Jordan D., Xiong Y., Ma Y., Lyapunov A.N., Chen G., Kulakova O.I., Sun Y., Lee S.G., Bronson R.T., Moskalev A.A., Sunyayev S.R., Zhang G., Krogh A., Wang J., Gladyshev V.N. Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat *Myotis brandtii*. *Nat. Commun.* 2013;4:2212. DOI 10.1038/ncomms3212.
- Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A., Plyusnina E.N. Effect of *PARP-1* overexpression and pharmacological inhibition of NF- κ B on the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Adv. Gerontol.* 2011;24(3):405-419.
- Shaposhnikov M., Proshkina E., Shilova L., Zhavoronkov A., Moskalev A. Lifespan and stress resistance in *Drosophila* with overexpressed DNA repair genes. *Sci. Rep.* 2015;5:15299. DOI 10.1038/srep15299.
- Shaw W.M., Luo S., Landis J., Ashraf J., Murphy C.T. The *C. elegans* TGF- β Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling. *Curr. Biol.* 2007;17(19):1635-1645. DOI 10.1016/j.cub.2007.08.058.
- Simmonds R.E., Foxwell B.M. Signalling, inflammation and arthritis: NF- κ B and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(5):584-590. DOI 10.1093/rheumatology/kem298.
- Simonsen A., Cumming R.C., Brech A., Isakson P., Schubert D.R., Finley K.D. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy*. 2008;4(2):176-184.
- Sinha M., Jang Y.C., Oh J., Khong D., Wu E.Y., Manohar R., Miller C., Regalado S.G., Loffredo F.S., Pancoast J.R., Hirshman M.F., Lebowitz J., Shadrach J.L., Cerletti M., Kim M.J., Serwold T., Goodyear L.J., Rosner B., Lee R.T., Wagers A.J. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science*. 2014;344(6184):649-652. DOI 10.1126/science.1251152.
- Slack C., Alic N., Foley A., Cabecinha M., Hoddinott M.P., Partridge L. The Ras-Erk-ETS-signaling pathway is a drug target for longevity. *Cell*. 2015;162(1):72-83. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.023.
- Smith J.S., Brachmann C.B., Celic I., Kenna M.A., Muhammad S., Starai V.J., Avalos J.L., Escalante-Semerena J.C., Grubmeyer C., Wolberger C. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2000;97(12):6658-6663.
- Snell T.W., Johnston R.K., Rabeneck B., Zipperer C., Teat S. Joint inhibition of TOR and JNK pathways interacts to extend the lifespan of *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Exp. Gerontol.* 2014;52:55-69. DOI 10.1016/j.exger.2014.01.022.
- Solovyev I.A., Dobrovolskaya E.V., Moskalev A.A. Genetic control of circadian rhythms and aging. *Russ. J. Genet.* 2016;52(4):343-361.
- Stenesen D., Suh J.M., Seo J., Yu K., Lee K.-S., Kim J.-S., Min K.-J., Graff J.M. Adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK regulate adult life span and mediate the longevity benefit of caloric restriction in flies. *Cell Metab.* 2013;17(1):101-112.
- Sung B., Park S., Yu B.P., Chung H.Y. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPAR γ activator: suppression of NF- κ B by 2, 4-thiazolidinedione. *Exp. Gerontol.* 2006;41(6):590-599.
- Swindell W.R., Masternak M.M., Kopchick J.J., Conover C.A., Bartke A., Miller R.A. Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarf mice. *Mech. Ageing Dev.* 2009;130(6):393-400.
- Sykiotis G.P., Bohmann D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell*. 2008;14(1):76-85. DOI 10.1016/j.devcel.2007.12.002.
- Symphorien S., Woodruff R.C. Effect of DNA repair on aging of transgenic *Drosophila melanogaster*: *l. mei-1* locus. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2003;58(9):B782-B787.
- Szwergold B.S., Miller C.B. Potential of birds to serve as a pathology-free model of type 2 diabetes, Part 1. Is the apparent absence of the rage gene a factor in the resistance of avian organisms to chronic hyperglycemia? *Rejuven. Res.* 2014;17(1):54-61. DOI 10.1089/rej.2013.1498.
- Tan Q., Soerensen M., Kruse T.A., Christensen K., Christiansen L. A novel permutation test for case-only analysis identifies epistatic effects on human longevity in the *FOXO* gene family. *Aging Cell*. 2013;12(4):690-694. DOI 10.1111/accel.12092.
- Tan V.P., Miyamoto S. Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2016. DOI 10.1016/j.yjmcc.2016.01.005.
- Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., Garofalo R.S. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends lifespan and impairs neuroendocrine function. *Science*. 2001;292(5514):107-110. DOI 10.1126/science.1057987.
- Taylor R.C., Dillin A. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harbor Persp. Biol.* 2011;3(5):a004440.
- Tian J., Yan Z., Wu Y., Zhang S.L., Wang K., Ma X.R., Guo L., Wang J., Zuo L., Liu J.Y., Quan L., Liu H.R. Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010;31(10):1324-1328. DOI 10.1038/aps.2010.111.
- Tomaru U., Takahashi S., Ishizu A., Miyatake Y., Gohda A., Suzuki S., Ono A., Ohara J., Baba T., Murata S. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* 2012;180(3):963-972.
- Tran H., Brunet A., Grenier J.M., Datta S.R., Fornace A.J., Jr., DiStefano P.S., Chiang L.W., Greenberg M.E. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*. 2002;296(5567):530-534. DOI 10.1126/science.1068712.
- Tsurumi A., Li W.X. Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics*. 2012;7(7):680-688. DOI 10.4161/epi.20540.
- Tsutsui M., Shimokawa H., Otsuji Y., Ueta Y., Sasaguri Y., Yanagihara N. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice. *Circ. J.* 2009;73(6):986-993.
- Twumasi-Boateng K., Wang T.W., Tsai L., Lee K.H., Salehpour A., Bhat S., Tan M.W., Shapira M. An age-dependent reversal in the protective capacities of JNK signaling shortens *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Aging Cell*. 2012;11(4):659-667. DOI 10.1111/j.1474-9726.2012.00829.x.
- Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., Park S.H., Thompson T., Karsenty G., Bradley A., Donehower L.A. *p53* mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415(6867):45-53. DOI 10.1038/415045a.
- Ulgherait M., Rana A., Rera M., Graniel J., Walker D.W. AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner. *Cell Reports*. 2014;8(6):1767-1780.
- Ungar L., Harari Y., Toren A., Kupiec M. Tor complex 1 controls telomere length by affecting the level of Ku. *Curr. Biol.* 2011;21(24):2115-2120. DOI 10.1016/j.cub.2011.11.024.

- Ungvari Z., Ridgway I., Philipp E.E., Campbell C.M., McQuary P., Chow T., Coelho M., Didier E.S., Gelino S., Holmbeck M.A., Kim I., Levy E., Sosnowska D., Sonntag W.E., Austad S.N., Csiszar A. Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2011;66(7):741-750. DOI 10.1093/gerona/glr044.
- Vajapey R., Rini D., Walston J., Abadir P. The impact of age-related dysregulation of the angiotensin system on mitochondrial redox balance. *Front. Physiol.* 2014;5:439. DOI 10.3389/fphys.2014.00439.
- Van Deursen J.M. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014;509(7501):439-446. DOI 10.1038/nature13193.
- Van Meter M., Kashyap M., Rezazadeh S., Geneva A.J., Morello T.D., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 represses *LINE1* retrotransposons by ribosylating *KAP1* but this repression fails with stress and age. *Nat. Commun.* 2014;5:5011. DOI 10.1038/ncomms6011.
- Vermeulen C.J., Van De Zande L., Bijlsma R. Resistance to oxidative stress induced by paraquat correlates well with both decreased and increased lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology.* 2005;6(6):387-395. DOI 10.1007/s10522-005-4903-2.
- Wang M.C., Bohmann D., Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 2003;5(5):811-816.
- Wang Y., Sun Z. Antiaging gene *Klotho* regulates endothelin-1 levels and endothelin receptor subtype B expression in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2014;32(8):1629-1636.
- Weiss A., Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013;2(1):47-63. DOI 10.1002/wdev.86.
- White T.A., LeBrasseur N.K. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges – A mini-review. *Gerontology.* 2014;60(4):289-293.
- Willcox B.J., Tranah G.J., Chen R., Morris B.J., Masaki K.H., He Q., Willcox D.C., Allsopp R.C., Moisyadi S., Poon L.W., Rodriguez B., Newman A.B., Harris T.B., Cummings S.R., Liu Y., Parimi N., Evans D.S., Davy P., Gerschenson M., Donlon T.A. The *FoxO3* gene and cause-specific mortality. *Aging Cell.* 2016. DOI 10.1111/ace1.12452.
- Xia H., Suda S., Bindom S., Feng Y., Gurley S.B., Seth D., Navar L.G., Lazartigues E. ACE2-mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22682. DOI 10.1371/journal.pone.0022682.
- Xie J., Yoon J., An S.-W., Kuro-o M., Huang C.-L. Soluble Klotho protects against uremic cardiomyopathy independently of fibroblast growth factor 23 and phosphate. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015;26(5):1150-1160.
- Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Watanabe T., Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J. Pharmacol. Sci.* 2005;97(3):305-311.
- Zhang G., Li J., Purkayastha S., Tang Y., Zhang H., Yin Y., Li B., Liu G., Cai D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature.* 2013;497(7448):211-216. DOI 10.1038/nature12143.
- Zhang R., Chen H.-Z., Liu D.-P. The four layers of aging. *Cell Systems.* 2015;1(3):180-186.
- Zhao G., Hatting M., Nevzorova Y.A., Peng J., Hu W., Boekschoten M.V., Roskams T., Muller M., Gassler N., Liedtke C., Davis R.J., Cubero F.J., Trautwein C. Jnk1 in murine hepatic stellate cells is a crucial mediator of liver fibrogenesis. *Gut.* 2014;63(7):1159-1172. DOI 10.1136/gutjnl-2013-305507.

Стволовые клетки растений: единство и многообразие

И.Е. Додуева , В.Е. Творогова, М. Азарахш, М.А. Лебедева, Л.А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

Стволовые клетки – недифференцированные клетки многоклеточных организмов, способные делиться, самообновляться и дифференцироваться. Несмотря на существующие различия свойств, у всех многоклеточных организмов можно выделить общие принципы существования стволовых клеток. У растений стволовые клетки находятся в меристемах – структурах, обеспечивающих непрерывный рост растения и предоставляющих материал для образования различных специализированных тканей. Выделяют разнообразие типов меристем: апикальные – побега и корня, латеральные (прокамбий, камбий, перицикл), а также так называемые нерегулярные, развивающиеся при определенных условиях (каллус, меристемы симбиотических клубеньков, спонтанные и патоген-индуцированные опухоли и т. д.). Для каждой из меристем выявлены специфические механизмы регуляции, для которых характерно взаимодействие фитогормонов и основных групп транскрипционных факторов. Активность меристем обусловлена двумя противоположными процессами: пролиферацией и самообновлением стволовых клеток в центральной части меристемы и дифференцировкой специализированных клеток на периферии. Системы WOX-CLAVATA – консервативный для разных меристем регуляторный компонент, который обеспечивает размер и постоянство состава меристемы, а также баланс пролиферации и дифференцировки стволовых клеток. В обзоре рассмотрены сходство и различие принципов организации ниш стволовых клеток у растений и животных, а также в разнообразных меристемах высших растений; особое внимание уделено роли систем WOX-CLAVATA в поддержании меристем и их взаимодействию с другими меристемными регуляторами.

Ключевые слова: стволовые клетки; меристемы; WOX; CLE-пептиды; LRR-киназы; апикальные меристемы; камбий; перицикл; каллус; опухоли; клубеньки.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Додуева И.Е., Творогова В.Е., Азарахш М., Лебедева М.А., Лутова Л.А. Стволовые клетки растений: единство и многообразие. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):441-458. DOI 10.18699/VJ16.172

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dodueva I.E., Tvorogova V.E., Azarakhsh M., Lebedeva M.A., Lutova L.A. Plant stem cells: unity and diversity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):441-458. DOI 10.18699/VJ16.172


УДК 581.1:575.1

Поступила в редакцию 31.05.2016 г.

Принята к публикации 19.07.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

Plant stem cells: unity and diversity

I.E. Dodueva , V.E. Tvorogova, M. Azarakhsh, M.A. Lebedeva, L.A. Lutova

Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg, Russia

Stem cells are undifferentiated cells of multicellular organisms that can divide, self-renew and differentiate. Despite the differences of properties, general principles of the existence of stem cells can be distinguished in all multicellular organisms. In plants, stem cells are found in meristems – the structures that ensure the continuous growth of plant and provide material for the formation of various specialized tissues. There are numerous types of meristems: shoot and root apical meristems, lateral meristems (procambium, cambium, pericycle), as well as the so-called irregular meristems, developing under certain conditions (callus, meristems of symbiotic nodules, spontaneous and pathogen-induced tumors, etc.). For each of meristems, specific mechanisms of regulation, which are based on the interaction of plant hormones and the major groups of transcription factors, were identified. The activity of meristems is based on two opposite processes: proliferation and self-renewal of stem cells in the central part of the meristem and differentiation of specialized cells in the periphery. WOX-CLAVATA systems are a regulatory component conservative for different meristems and providing consistency of the composition of the meristem, as well as the balance of stem cell proliferation and differentiation. In this review, we will consider the similarities and differences between the principles of organization of stem cell niches in plants and animals, as well as in a variety of meristems of higher plants; special attention will be paid to the role of WOX-CLAVATA systems in maintaining meristems and their interaction with other meristem regulators.

Keywords: stem cells; meristems; WOX; CLE-peptides; LRR-kinases; apical meristems; cambium; pericycle; callus; tumors; nodules.

Стволовые клетки (СК) – недифференцированные клетки многоклеточных организмов, способные делиться посредством митоза, самообновляться, образуя новые СК, и дифференцироваться в специализированные клетки. Термин «стволовые клетки» был предложен в 1909 г. гистологом А. Максимовым, впервые описавшим гемопоэтические стволовые клетки. Помимо способности к самообновлению, СК обладают свойством потентности, т. е. способностью давать потомство в виде определенного количества типов специализированных клеток. В соответствии с этим СК животных делятся на тотипотентные (омнипотентные), способные дифференцироваться в клетки эмбриональных тканей; плюрипотентные – потомки тотипотентных, которые могут давать начало практически всем тканям, за исключением эмбриональных; олигопотентные, которые могут дифференцироваться лишь в некоторые близкие по свойствам типы клеток; и унипотентные, или клетки-предшественницы, дающие начало одному определенному типу клеток. У животных тотипотентны клетки, возникающие после первых делений дробления, клетки бластоциты уже не равноценны и плюрипотентны. Ключевое отличие СК растений от СК животных – тотипотентность всех без исключения СК растений. Более того, тотипотентны у растений практически все живые дифференцированные клетки, которые могут обретать свойства СК в процессе дедифференцировки – это свойство лежит в основе высокой способности растений к регенерации, соматическому эмбриогенезу (СЭ) и вегетативному размножению.

Несмотря на имеющиеся различия свойств, у всех многоклеточных организмов можно выделить общие принципы существования стволовых клеток:

1. Высокая потентность и отсутствие маркеров дифференцировки.

2. Большая продолжительность клеточного цикла. Стволовые клетки делятся очень медленно, длительность клеточного цикла у них порой в десятки раз превышает таковую в окружающих клетках. При нормальных условиях СК животных и растений находятся в основном на стадии G₀. Так, гемопоэтические СК в нормальных условиях делятся всего лишь каждые 145 дней (Trump et al., 2010), длительность клеточного цикла у клеток покоящегося центра корневой меристемы в 6–10 раз больше, чем у окружающих клеток (Иванов, 2007).

3. Способность к самоподдержанию и асимметричным делениям, при которых продуцируется одна СК и одна клетка, вступающая на путь активного деления и затем приступающая к дифференцировке.

4. Существование в специальных компартментах, поставляющих сигналы для поддержания СК, – нишах стволовых клеток. Термин «ниша стволовых клеток» впервые предложил для гемопоэтических СК R. Schofield в 1978 г. Ниша СК определена им как «ограниченное специализированное микроокружение, которое интегрирует и осуществляет межклеточные сигналы для регуляции и поддержания гомеостаза принадлежащих ей стволовых клеток».

Основные функции ниши СК следующие:

- Предотвращение дифференцировки СК путем предохранения их от сигналов дифференцировки, поступающих

из соседних тканей. У животных нишу для определенного типа СК может составлять определенный тип дифференцированных клеток, например, нишу гемопоэтических СК составляют остеобласты, остеокласты, мезенхимальные предшественники, ретикулярные клетки (Trump et al., 2010). У животных ниша СК может оставаться свободной и в дальнейшем ее могут занять новые клетки; пустые ниши могут существовать независимо от СК и при трансплантации в них СК обеспечивать их нормальное функционирование.

- Обеспечение самоподдержания СК и длительного пребывания в состоянии покоя. Эта задача ниши связана не только с поддержанием «запаса» СК, но и с необходимостью ограничения пролиферации СК до минимального уровня, нормально поддерживающего тканевой гомеостаз. Для самоподдержания СК должны получать от своего микроокружения (ниши) определенные сигналы.
- Создание условий для максимальной защищенности СК от неблагоприятных воздействий. Отчасти эти условия обеспечиваются изолирующими свойствами ниши, отчасти – свойствами самих СК: так, в покоящихся гемопоэтических СК высокая устойчивость к повреждениям ДНК достигается сильной индукцией белков p53 и p21 (Mohrin et al., 2010).

Для функционирования ниш СК необходимо множество взаимосвязанных механизмов: межклеточные взаимодействия СК друг с другом и соседними дифференцированными клетками, физико-химическое состояние окружающей среды и т. д. Важную роль играют также транскрипционные факторы (ТФ), регулирующие экспрессию генов в СК: так, функциональность гемопоэтических СК млекопитающих обеспечивают более 50 ТФ, образующих сложную регуляторную сеть (Kosan, Godman, 2016).

Клетка, покинувшая нишу СК, вступает на путь дифференцировки. Кроме того, СК не совсем однородны внутри самой ниши. У животных в результате деления СК дают начало дочерним клеткам с коротким клеточным циклом, которые первое время пребывают в пределах ниши. Эти дочерние клетки в результате нескольких последовательных делений создают популяцию транзиторных клеток, которые затем превращаются в дифференцированные клетки, выполняющие специфические функции в организме. Образование большого количества дифференцированных клеток обеспечивается именно за счет размножения транзиторных клеток при малом числе делений СК. Вместе с тем между СК и транзиторными клетками нет четкой границы, а скорее имеется постепенный переход: транзиторные клетки некоторое время могут сохранять свойства СК и при определенных условиях, например, гибели СК, могут заместить их (так называемые «потенциальные СК») (Wilson et al., 2008).

У растений ключевое значение для поддержания СК также имеют межклеточные взаимодействия, гормоны и ТФ. При этом ниши СК растений во многом отличаются от таковых у животных: они не изолируются от окружающих дифференцированных тканей и не могут существовать пустыми. Более того, если бы СК были изначально обнаружены на растениях – вряд ли первооткрывателем пришел в голову термин «ниша». Пулы СК растений находятся в окружении исключительно своих потом-

ков – дифференцированных клеток, которые поставляют сигналы, регулирующие размер пула СК и стимулирующие дифференцировку, сами же СК поставляют сигнал, предотвращающий дифференцировку клеток. Благодаря наличию градиентов концентрации этих сигналов имеет место самоподдержание СК в центре ниши и дифференцировка их потомков на периферии.

5. Наличие производимых самими СК внутриклеточных сигналов, которые важны для поддержания неограниченной пролиферации и подавления дифференцировки стволовых клеток. Так, для поддержания плюрипотентности эмбриональных СК необходима экспрессия гена, кодирующего ТФ Nanog, для поддержания олигопотентных гемопоэтических СК – ТФ Scf/Tal1, Gfi1 и Gfi1b, Gata2 (Kosan, Godman, 2016). У растений поддержание «стволового статуса» клеток достигается экспрессией определенных генов семейства WOX (WUSCHEL-related Homeobox), продуктами которых являются гомеодомен-содержащие ТФ (van der Graaf et al., 2009), речь о них пойдет ниже.

Стволовые клетки растений локализуются в меристемах – структурах, содержащих ниши СК, на периферии которых имеет место дифференцировка специализированных типов клеток. В отличие от животных, тотипотентные СК в меристемах существуют длительное время, поддерживая органогенез в течение всего жизненного цикла. Наибольшее значение для развития растений имеют первичные меристемы, которые закладываются в ходе эмбрионального развития – апикальные меристемы (АМ) побега (ПАМ) и корня (КАМ) и латеральные меристемы (ЛМ) – прокамбий и перицикл. Кроме того, в течение постэмбрионального периода у растений могут возникать вторичные меристемы как из первичных меристем, например закладка КАМ боковых корней из клеток перицикла, камбия из прокамбия, так и из специализированных тканей в результате дедифференцировки, например, развитие придаточных корней из дифференцированных клеток гипокотыля, листа и т. д. К вторичным меристемам относят АМ вторичных побегов, боковых и придаточных корней, ЛМ камбий и феллоген, интеркалярные меристемы междоузлий, а также дополнительные меристемы, возникающие при определенных условиях: раневые меристемы, меристемы клубеньков у бобовых, меристемоподобные структуры, развивающиеся при взаимодействии с некоторыми патогенами, и т. д.

В основе активности меристем лежат два противоположных процесса – самообновление СК в центральной части меристемы и дифференцировка специализированных клеток на периферии. Интересно, что в меристеме количество СК остается, как правило, неизменным, что свидетельствует о существовании механизмов, обеспечивающих баланс их пролиферации и дифференцировки. Вероятно, эти механизмы могут быть как сходными, так и различными в разных меристемах (см. далее).

Как уже было отмечено, в меристемах растений источником сигналов, предотвращающих дифференцировку СК, служат не столько окружающие их дифференцированные ткани, сколько недифференцированные клетки самой меристемы. К числу внешних факторов, регулирующих поддержание меристем, относятся фитогормоны: ауксины, цитокинины (ЦК), гиббереллины, определенные

представители группы СLE-пептидов. При этом одни гормоны поддерживают СК в меристемах, а другие подавляют их активность (Galinha et al., 2009). Более того, один и тот же гормон может оказывать противоположное действие на разные меристемы, например, противоположное действие ауксинов и цитокининов на апикальные меристемы побега и корня.

Специфической особенностью АМ является наличие в центральной зоне меристемы так называемого организующего центра (ОЦ), который служит источником сигнала, подавляющего дифференцировку стволовых клеток. Латеральные меристемы (прокамбий, камбий, перицикл), по-видимому, лишены четко локализованного ОЦ; существование ОЦ в других меристемах остается вопросом дискуссионным. По мере деления дочерние клетки удаляются от ОЦ, оказываясь вне зоны действия сигналов, им продуцируемых, и претерпевают дифференцировку. Потеря функции ОЦ, например, в результате мутаций по ключевым генам-регуляторам его активности, приводит к утрате способности меристемы к самоподдержанию, дифференцировке всех СК и быстрому прекращению активности меристемы.

Организирующий центр представляет собой маленькую группу медленно делящихся клеток, максимально приближающихся по свойствам к СК животных. В числе этих свойств расположение ОЦ (сохранение их в неизменной позиции все время существования), медленное деление, отсутствие признаков дифференцировки (накопления вторичных метаболитов, экспрессии маркерных генов дифференцировки, характерных для окружающих клеток меристемы), способность к асимметричному делению (одна из дочерних клеток остается в ОЦ, вторая выходит за его пределы и приступает к активному делению) (Иванов, 2003, 2007).

В связи с этим возникает терминологический вопрос: какие именно клетки растений следует называть стволовыми? Как правило, в англоязычной литературе при описании структуры АМ рассматривают два самостоятельных понятия: ОЦ и пул СК, прилегающий к нему, т. е. термин «стволовые клетки» (stem cells) применяют в основном к находящимся в меристеме активно делящимся потомкам клеток ОЦ. В то же время гораздо более корректна позиция, при которой клетки ОЦ выделяют в особую категорию СК, сохраняющих «стволовой» статус в более полном, чем у других клеток, виде. По сути, если рассматривать их с точки зрения сходства СК всех многоклеточных организмов, то именно клетки ОЦ следует называть стволовыми в самом строгом значении этого термина, и все клетки корня и стебля, так или иначе, являются их потомками. Для клеток ОЦ даже был предложен термин «апикальные стволовые клетки» (apical stem cells), присутствующие только в АМ (Иванов, 2003, 2007), или «организующие клетки» (organizing cells) (Heidstra, Sabatini, 2014). В то же время потомки клеток ОЦ, составляющие основную часть меристемы, вероятно, можно считать аналогом транзиторных клеток животных.

Несмотря на чрезвычайную значимость ОЦ в морфогенезе растений, их размеры очень невелики: так, ОЦ КАМ, называемый также покоящимся центром, включает в себя не более 1 % клеток меристемы, которые, как и СК

животных, делятся с гораздо меньшей скоростью, чем окружающие их клетки меристемы. Вместе с тем, как и у животных, грань между СК и транзиторными клетками не очень четкая, и уникальные свойства клеток ОЦ зависят не столько от их функциональных особенностей, сколько от их расположения и межклеточных взаимодействий. Так, при разрушении ОЦ КАМ или декапитации корня возможно восстановление ОЦ из окружающих клеток меристемы, уже перешедших к активным делениям, или даже из клеток, недавно покинувших меристему (Feldman, 1976; Иванов, 2003). Более того, при определенных условиях: для обеспечения процессов регенерации, соматического эмбриогенеза (СЭ), вегетативного размножения – у растений могут закладываться новые АМ, содержащие ОЦ, не только из существующих меристем, но и из дифференцированных тканей разных органов (Ikeuchi et al., 2013; Jiang et al., 2015).

Согласно имеющимся данным, поддержание свойств ОЦ группой клеток обусловлено экспрессией определенных генов семейства *WOX*, которые кодируют гомеодоменсодержащие ТФ. Так, в ПАМ эти процессы регулирует ТФ WUS (Mayer et al., 1998), в КАМ – ТФ WOX5 (Sarkar et al., 2007). Экспрессия этих генов начинается при закладке ПАМ и КАМ в эмбриогенезе и строго приурочена к ОЦ в постэмбриональном развитии (Haescker et al., 2004). Возникновение ОЦ *de novo* из потомков дифференцированных клеток, например, при СЭ, также связано с возобновлением экспрессии генов *WUS* и *WOX5* в определенных группах клеток, дающих начало ПАМ и КАМ соматических эмбрионов (Su et al., 2015). Следует отметить, что, помимо КАМ, ТФ WOX5 регулирует также поддержание разных типов меристем, развивающихся из перичикла и являющихся модифицированными вариантами бокового корня (меристемы клубеньков, некоторые типы опухолей и каллуса) (Sugimoto et al., 2010; Виноградова и др., 2015; Lebedeva et al., 2015). Еще один ТФ этой группы – WOX4 – регулирует развитие ЛМ прокамбия и камбия (Ji et al., 2010). В контроле активности меристем первостепенное значение имеет взаимодействие ТФ WOX с системами типа CLAVATA, которые включают в себя короткие сигнальные пептиды, относящиеся к семейству пептидных фитогормонов CLE, и их рецепторы – киназы семейства LRR-RLK (Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase). Сравнительно недавно было показано, что в регуляции поддержания СК в меристемах участвует еще одна группа ТФ – HAM (Hairy Meristem), относящиеся к семейству GRAS. Транскрипционные факторы HAM связываются с ТФ WOX, будучи их кофакторами. Как и в случае WOX, для каждой из меристем характерен свой узкоспецифичный ТФ группы HAM: в ПАМ это HAM1, взаимодействующий с WUS, в КАМ – HAM2, специфично связывающийся с WOX5, в камбии – HAM4, взаимодействующий с WOX4 (Zhou et al., 2015).

Всего у арабидопсиса отмечено 15 ТФ WOX, которые можно разделить на три клады: древнюю, или WOX13-кладу (белки WOX10, 13 и 14), представители которой имеются у всех растений начиная с зеленых водорослей, промежуточную, или WOX9-кладу (WOX8, 9, 11 и 12), которая в эволюции растений впервые возникла у плаунов, и современную, или WUS-кладу (ТФ WUS и WOX1-7) –

особенность исключительно семенных растений (van der Graaf et al., 2009). Наиболее изучены ТФ WOX современной клады, представители которой играют центральную роль в контроле активности меристем (WUS, WOX4, WOX5) (Mayer et al., 1998; Sarkar et al., 2007; Ji et al., 2010), ранних этапов эмбриогенеза (WOX2) (Breuninger et al., 2008), развитии листа (WOX1, 3) и органов цветка (WOX6) (Lin et al., 2013). Транскрипционные факторы промежуточной клады WOX8 и WOX9 являются регуляторами первичной разметки зародыша (Breuninger et al., 2008; Ueda et al., 2011), функция большинства белков древней клады WOX неизвестна, для некоторых из них показана функция в контроле активности ЛМ (WOX14) (Etchells et al., 2012). Транскрипционные факторы WOX, по крайней мере относящиеся к современной ветви, могут выполнять функции как транскрипционных активаторов, так и репрессоров (Leibfried et al., 2005; Yadav et al., 2011), для этого у ТФ WOX имеются соответствующие домены с разными функциями: WUS-бокс, который способен взаимодействовать с корепрессорами транскрипции группы TOPLESS (Zhang et al., 2014), EAR-домен, также работающий как транскрипционный репрессор, и кислый домен, который предположительно нужен для активации транскрипции (Dolzblasz et al., 2016). WUS-бокс, а также EAR и/или кислый домен присутствуют у всех представителей современной ветви ТФ WOX. Недавно было показано, что для поддержания ОЦ ПАМ посредством ТФ WUS необходим функционально активный WUS-бокс, тогда как другие домены белка WUS для этого не важны (Dolzblasz et al., 2016). Модифицированный WUS-бокс есть также у представителей промежуточной ветви ТФ WOX, тогда как у белков древней клады он отсутствует; вероятно, в связи с этим ТФ промежуточной и древней клады, поставленные под промотор гена *WUS*, не могут компенсировать дефекты развития у мутанта *wus*. Вместе с тем комплементировать мутацию *wus* не может также один из белков, относящихся к современной ветви ТФ WOX, – WOX4, который регулирует развитие камбия (Dolzblasz et al., 2016). Возможно, с таким функциональным отличием WOX4 от других ТФ WOX современной ветви связана «нестандартная» организация WOX-CLAVATA-зависимой регуляции активности камбия (см. об этом далее).

Помимо *WOX* генов, важное значение для закладки и поддержания ОЦ имеют экспрессия целого ряда других «меристем-специфичных» генов, кодирующих ТФ разных групп. В данном обзоре мы рассмотрим механизмы закладки и поддержания СК в разных типах меристем, уделив особое внимание вторичным меристемам, которые в настоящее время менее изучены, чем апикальные меристемы побега и корня.

Апикальные меристемы побега и корня: разные меристемы на едином фундаменте

Апикальные меристемы побега и корня обеспечивают рост осевых органов – побега и главного корня – и формирование надземной и подземной части растения. По своей организации ПАМ и КАМ характеризуются рядом сходных черт, в особенности по принципам регуляции. Апикальная меристема побега включает в себя корпус

и туники, которая состоит из трех слоев клеток: L1, L2 и L3. В ПАМ можно выделить две зоны: центральную, которая включает в себя ОЦ и небольшое количество лежащих над ним недифференцированных клеток трех слоев туники, и периферическую, которая состоит из быстро делящихся клеток, дающих начало разным типам тканей. На периферии ПАМ формируются зачатки латеральных органов – листьев или цветков, в зависимости от стадии развития. В ПАМ наиболее ярко видна более высокая потенция СК растений в сравнении с СК животных: у животных СК в постэмбриональном периоде дают начало определенному типу тканей, тогда как на периферии ПАМ СК образуют новые органы (листья и цветки), состоящие из разных типов тканей.

В отличие от ПАМ, судьба клеток КАМ более детерминирована. Апоикальная меристема корня включает в себя организующий, или покоящийся центр (ПЦ) – очень небольшую группу медленно делящихся стволовых клеток (у арабидопсиса ПЦ состоит всего из четырех клеток) – и клетки проксимальной меристемы – инициалы, которые делятся с большей скоростью. В результате последовательных делений клеток-инициал образуются линейные ряды клеток, дающие начало основным тканям корня: эпидерме, проводящим тканям, первичной коре, эндодерме, а также колумелле. В отличие от ПАМ, инициация латеральных органов корня – боковых корней – у большинства видов растений происходит вне апоикальной меристемы, в вышележащей дифференцированной зоне и включает в себя реинициацию деления клеток периклики (Dubrovsky et al., 2000).

Размеры ОЦ ПАМ и КАМ, а также размеры этих меристем в целом и количество клеток в них остаются, как правило, постоянными. Существуют механизмы, поддерживающие состав АМ в неизменном виде. Во-первых, это механизмы, связанные с контролем клеточного цикла. Так, известно, что в АМ поддерживается определенный уровень экспрессии гена *RETINOBLASTOMA RELATED (RBR)*; в КАМ белок RBR взаимодействует с ТФ SCR (*SCARECROW*), отвечающим за спецификацию ПЦ (Cruz-Ramirez et al., 2013). На примере ПЦ КАМ показано, что в репрессии деления СК также участвует убиквитинлигазный комплекс APC/C (anaphase-promoting complex), который регулирует деградацию циклинов (Vanstraelen et al., 2009). Другую группу регуляторов размера и структуры меристем представляют системы CLAVATA, речь о которых пойдет далее.

Как было отмечено выше, поддержание ОЦ ПАМ и КАМ определяется экспрессией в их клетках генов, кодирующих ТФ семейства *WOX* – в ПАМ это ген *WUS (WUSCHEL)*, в КАМ – его паралог *WOX5*. В связи с этим предполагают, что функция ТФ *WUS* и *WOX5* связана с предотвращением дифференцировки клеток ОЦ и соседних СК. Гены *WUS* и *WOX5* активируются в зародыше на стадии 16 клеток (Haescker et al., 2004) и с самого начала имеют зеркальный характер экспрессии: экспрессия *WUS* – маркер апоикального домена зародыша, тогда как экспрессия *WOX5* – маркер базального домена. В постэмбриональном развитии растений экспрессия генов *WUS* и *WOX5* ограничивается в ОЦ ПАМ (*WUS*) и КАМ (*WOX5*) (Haescker et al., 2004). Опыты по взаим-

ному замещению генов *WUS* и *WOX5*, когда экспрессию гена *WUS* индуцировали в корне мутантов *wox5* и наоборот, показали, что эти гены имеют идентичные функции в контроле пулов СК ПАМ и КАМ и могут замещать друг друга, восстанавливая нормальный фенотип у мутантов (Sarkar et al., 2007).

Экспрессия *WOX5* и *WUS* ограничена в пределах ОЦ благодаря действию систем CLAVATA. В ПАМ функцию ограничителей экспрессии *WUS* выполняют рецепторные протеинкиназы семейства LRR RLK (Leucin Reach Repeats containing Receptor-Like Kinases) CLAVATA1 и CLAVATA2/CORYNE и их лиганд – CLE-пептид CLAVATA3 (CLV3) (Schoof et al., 2000); в КАМ это рецепторная киназа из того же семейства ACR4 и ее лиганд – пептид CLE40 (Stahl et al., 2009). Связывая лиганд (CLE-пептид), рецепторы CLV1 и CLV2/CRN в ПАМ и ACR4 в КАМ запускают сигнальный путь, приводящий к репрессии транскрипции генов *WUS* и *WOX5* соответственно. К числу выявленных компонентов этого сигнального пути относятся малая ГТФаза ROP (Trotochaud et al., 1999), MAP-киназный каскад (Betsuyaku et al., 2011), а также протеинфосфатазы семейства 2C POLTERGEIST (POL) и POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1) (Gagne, Clark, 2010). Структура и размеры АМ во многом обусловлены взаимной регуляцией ТФ *WOX* и компонентов систем CLAVATA, а также областями экспрессии кодирующих их генов. Гены *CLV3* в побегах и *CLE40* в корне экспрессируются непосредственно над и под клетками ОЦ соответственно: *CLV3* – в слоях L1–L3 центральной зоны ПАМ (Kondo et al., 2006), *CLE40* – в инициалах колумеллы (Hobe et al., 2003). Оттуда CLE-пептиды могут перемещаться в лежащие ближе к центру слои клеток, подавляя в них экспрессию *WUS* и *WOX5*. Зоны экспрессии генов, кодирующих рецепторы CLV1 и ACR4, частично перекрываясь с зонами экспрессии *CLE40* и *WOX* (Lenhard, Laux, 2003; Stahl et al., 2009), образуют барьер на пути перемещающихся пептидов CLV3 и CLE40: большая часть CLE-пептидов связывается рецепторами, не доходя до ОЦ, – таким образом, сохраняется свободная от CLE-пептидов область экспрессии генов *WOX*. В свою очередь ТФ *WUS* непосредственно активируют экспрессию гена *CLV3*, образуя негативную обратную связь в регуляции организующего центра. Для этого белок *WUS* перемещается в вышележащие слои клеток туники (Yadav et al., 2011); перемещения белка *WOX5* показаны не были, но, вероятно, он также может это продлевать.

Помимо гена *CLV3*, к прямым мишеням ТФ *WUS* относится ген, кодирующий рецептор CLV1, – *WUS* негативно регулирует его экспрессию (Busch et al., 2010), а также гены, участвующие в регуляции передачи сигнала цитокининов и ауксинов. Так, ТФ *WUS* напрямую подавляет экспрессию генов *ARR5* и *ARR7* – репрессоров ответа на цитокинин (Leibfried et al., 2005). Мишени ТФ *WOX5* в настоящий момент неизвестны.

Помимо консервативных механизмов регуляции АМ, устроенных по сходному принципу (*WOX-CLAVATA + АМ*), существуют также регуляторные механизмы, специфичные для каждой из АМ, они отвечают за закладку АМ и спецификацию их ОЦ. В ПАМ это ТФ *KNOX* класса I (*KNOX I*), представители которых важны для закладки

ПАМ в эмбриогенезе (STM), пролиферации клеток ПАМ (STM, KNAT1, KNAT2, KNAT6), формирования листовых примордиев (KNAT1) и границы между примордиями и ПАМ (KNAT6), развитии соцветия и органов цветка (KNAT1, KNAT2) (Chuck et al., 1996; Long et al., 1996; Rautot et al., 2001; Belles-Boix et al., 2006). В регуляции развития КАМ важную роль играют взаимодействующие ТФ SCR и SHR (SHORTROOT) из семейства GRAS, необходимые для спецификации ОЦ КАМ и правильного формирования радиальной структуры корня (Cruz-Ramírez et al., 2013), а также ТФ PLT (PLETHORA) из семейства AP2, создающие максимум концентрации ауксина в КАМ (Blilou et al., 2005), что также требуется для спецификации ОЦ апикальной меристемы корня.

Итак, ПАМ и КАМ обладают рядом сходных черт, главная из которых наличие организующего центра. Поддержание ОЦ и их размер регулируется системами WOX-CLAVATA, которые в ПАМ и КАМ также организованы аналогично и зависят от активности генов-паралогов *WUS* и *WOX5* (Sarkar et al., 2007). Известно, что у голосеменных *WUS* и *WOX5* представлены проортологом *WUS/WOX5*, который экспрессируется в ПАМ и КАМ и необходим для развития как корня, так и побега, а также закладки их латеральных органов. В опытах по сверхэкспрессии проортолога *WUS/WOX5* у покрытосеменных, например у гена *GgWUS/WOX5* из *Gnetum gnemon* у арабидопсиса, показано развитие *clv*-подобного фенотипа с увеличением размера ПАМ и количества латеральных органов побега, что позволяет предположить сходство функций *WUS/WOX5* и *WUS* (Nardmann et al., 2009). Окончательно *WUS* и *WOX5* разделились только у покрытосеменных, вероятно, в результате дубликации гена *WUS/WOX5* у их предков (Nardmann, Weig, 2013).

Прокамбий и камбий: наше дело – строить тело

Прокамбий и камбий, называемые также сосудистыми меристемами или меристемами проводящей системы (*vascular meristems*), относятся к латеральным меристемам. В зрелых осевых органах – стеблях и корнях – ЛМ располагаются цилиндрическими слоями и на поперечных срезах имеют вид колец. Помимо прокамбия и камбия, в ЛМ входят перицикл и пробковый камбий (феллоген). Основная функция сосудистых меристем – построение проводящей системы (ПС), которая обеспечивает транспорт воды и минералов из корня к вышележащим частям растений и органических соединений в обратном направлении. Кроме того, сосудистые меристемы обеспечивают формирование большого числа проводящих элементов и паренхимы, что составляет основу роста осевых органов растений в толщину (вторичного утолщения) (Додуева и др., 2014).

Прокамбий закладывается в эмбриогенезе на стадии сердечка и дает начало первичной флоэме, а несколько позже – первичной ксилеме (Scheres et al., 1994). В постэмбриональном развитии из него образуются ткани проводящих пучков стебля. Камбий, как вторичная ЛМ, закладывается из прокамбия и перицикла; он обеспечивает образование вторичных проводящих элементов и таким образом играет основную роль в интенсивном вторичном

утолщении при развитии стеблей древесных растений, а также при формировании запасяющих корней.

Центральная часть камбия содержит слой или несколько слоев недифференцированных стволовых клеток. Анализ транскрипционного профиля клеток камбия у тополя позволил установить, что на периферии камбий содержит материнские клетки флоэмы с наружной стороны и материнские клетки ксилемы с внутренней, которые претерпевают асимметричные деления в антиклинальном направлении (Schrader et al., 2004). На периферии камбия потомки этих клеток дифференцируются в двух направлениях: к центру откладываются клетки вторичной ксилемы, а к периферии – вторичной флоэмы.

В закладке зачатков проводящей системы в эмбриогенезе растений центральную роль играет взаимодействие ЦК и ауксинов. При этом ЦК необходимы для закладки прокамбия и флоэмы, тогда как ауксины необходимы для дифференцировки ксилемы, а также, вероятно, влияют на пространственную организацию прокамбия (Bishopp et al., 2011a, b). В дальнейшем асимметричное деление клеток камбия обеспечено, главным образом, CLE-пептидами группы В (у арабидопсиса – CLE41/44 и CLE42) и их рецептором TDR/PXY (TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM) (Hirakawa et al., 2008).

Расположение разных типов тканей в стеле корня определяют цитокинины и ауксины (Bishopp et al., 2011a). Тот факт, что к наиболее серьезным последствиям приводит не повышение концентрации фитогормонов, а нарушение их рецепции и передачи сигнала, свидетельствует о том, что для развития проводящей системы важно возникновение не столько максимумов концентрации гормонов, сколько зон чувствительности к ним. Так, в корне проростка арабидопсиса цитокинины сосредоточены во флоэме и прокамбии, у мутантов по рецепции и передаче сигнала ЦК сокращается количество клеток проводящей системы, а оставшиеся дифференцируются по пути протоксилемы. Например, к такому эффекту приводит мутация *wol* (*wooden leg*), затрагивающая один из цитокининовых рецепторов – АНК4/WOL (Mähönen et al., 2000). Максимальная интенсивность ответа на ЦК, определенная по активности промотора ЦК-регулируемого гена ARR5, в стеле корня у проростка арабидопсиса сосредоточена в клетках прокамбия, прилегающих к тяжу первичной ксилемы (Bishopp et al., 2011a). Мишенью действия ЦК в этой области служат PIN белки, определяющие направление полярного транспорта ауксинов, – PIN3 (в клетках перицикла, прилегающих к протоксилеме) и PIN7 (в прокамбии и флоэме) (Bishopp et al., 2011b). Предполагают, что такое расположение PIN белков может направлять ауксин в центральный тяж ксилемы. Там ауксин индуцирует экспрессию белка-репрессора цитокининового ответа AHP6 (ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6), исключая ответ на цитокинины из зоны ксилемы (Mähönen et al., 2006). Другая группа регуляторов, которая определяет расположение тканей в стеле корня арабидопсиса, – ТФ HD-ZIPIII, ограничивающие размер прокамбия за счет стимуляции дифференцировки ксилемы (Pegems et al., 2010). Их экспрессия, в свою очередь, ограничена микроРНК 165/166, которые синтезируются

в эндодерме под влиянием взаимодействующих ТФ SCR и SHR (Carlsbecker et al., 2010).

Основную роль в поддержании камбия и правильной ориентации деления его клеток играет система CLAVATA и *WOX* гены. Первый CLE-пептид, участвующий в контроле активности камбия, – TDIF (Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor) – был выделен из культуры *Zinnia elegans* как фактор, стимулирующий пролиферацию камбиальных клеток и ингибирующий дифференцировку сосудистых элементов. Впоследствии TDIF-пептид, состоящий из 12 аминокислот, оказался идентичен CLE-пептидам группы В арабидопсиса CLE41 и CLE44; сходной функцией обладает также близкий к ним пептид CLE42 (Ito et al., 2006). Синтезируясь во флоэме, пептиды CLE41 и CLE44 перемещаются в камбий, где связываются с рецептором – CLV1-подобной киназой TDR/PXY на поверхности его клеток и запускают сигнальный путь, приводящий к активации пролиферации клеток камбия и подавлению их дифференцировки по ксилемному пути (Hirakawa et al., 2010).

К идентифицированным мишеням этого сигнального пути относится ген *WOX4*. Основная функция ТФ *WOX4* – поддержание стволовых клеток прокамбия и камбия (Hirakawa et al., 2010; Ji et al., 2010a); описана также роль этого ТФ в развитии сложных листьев у томата (Ji et al., 2010b) и поддержании вегетативной ПАМ риса (Ohmori et al., 2013). Уровень экспрессии гена *WOX4* быстро повышается в ответ на обработку TDIF пептидами. Таким образом, пептиды TDIF, они же CLE-пептиды группы В, в отличие от CLE-пептидов группы А, могут быть позитивными регуляторами экспрессии *WOX* генов. Для этого необходимо наличие активного рецептора TDR/PXY, т. е. ген *WOX4* служит прямой мишенью действия CLAVATA-подобной системы TDIF-TDR (Hirakawa et al., 2010). В многочисленных опытах с мутантами было показано, что активность ТФ *WOX4* необходима для поддержания TDIF-зависимой пролиферации клеток камбия, тогда как для TDIF-зависимого подавления дифференцировки сосудов требуется только активность TDR/PXY, но не *WOX4*. Таким образом, функция ТФ *WOX4* в поддержании камбия связана с контролем деления СК, а подавление их дифференцировки по ксилемному пути обеспечивают другие, не идентифицированные регуляторы, также находящиеся под контролем TDIF-TDR (Hirakawa et al., 2010). Транскрипционный фактор *WOX14*, относящийся к древней ветви *WOX* белков, может частично перекрывать функции *WOX4* в контроле деления клеток камбия. Ген *WOX14* экспрессируется не только в клетках камбия, но и в молодых сосудах; его экспрессия усиливается в ответ на обработку пептидами TDIF и снижается у мутантов *tdr/pxy*, т. е., по-видимому, он служит мишенью той же системы TDIF-TDR (Etchells et al., 2013).

Для обеспечения нормальной ориентации деления клеток камбия важно создание градиента концентрации пептидов TDIF, в норме такой градиент создается при поступлении TDIF из флоэмы. Изменение градиента концентрации TDIF в камбии, например, при экспрессии генов *CLE41* или *CLE42* под конститутивным или ксилем-специфичным промотором, приводит к изменению ориентации клеточных делений и нарушению упорядо-

ченной структуры стелы («перемешиванию» зон ксилемы, флоэмы и камбия) (Etchells et al., 2010). Сходный эффект вызывает мутация *tdr/pxy* (phloem intercalated with xylem) с потерей функции рецептора TDIF пептидов (Fisher, Turner, 2007).

Помимо TDIF пептидов, в поддержании камбия и развитии ПС могут участвовать также некоторые CLE-пептиды группы А. Действительно, обработка растений CLE-пептидами группы А или сверхэкспрессия их генов усиливает влияние сверхэкспрессии гена *CLE41* или экзогенного добавления пептидов TDIF на пролиферацию клеток камбия. Интересно, что совместный стимулирующий эффект *CLE41* и *CLE6* на пролиферацию клеток камбия усиливается при повышении концентрации ауксинов (Whitford et al., 2008). С другой стороны, CLE-пептиды группы А сами могут влиять на развитие камбия и проводящей системы. Так, сверхэкспрессия гена *CLE19 Arabidopsis* и *Brassica* стимулирует дифференцировку ксилемы, что приводит к образованию ксилемных «островков», не связанных с сосудистой системой растения, в органах цветка (Fiers et al., 2004).

Помимо TDR/PXY, в контроле активности камбия и развитии ПС могут участвовать и другие рецепторы LRR-RLK. Так, рецепторная киназа ER (ERECTA), относящаяся к тому же семейству белков, что TDR/PXY и другие рецепторы CLE-пептидов: мутация *er* нарушает структуру стелы, а также резко усиливает эффект мутации *tdr/pxy* (Etchells et al., 2012). Для нормального развития ПС также важна активность рецепторных киназ MOL1 (MORE LATERAL GROWTH1) и RUL (REDUCED IN LATERAL GROWTH1), которая наблюдается в зоне, не совпадающей с областью активности *CLE41/PXY* – во флоэме и прилегающем к ней слое клеток камбия (Agusti et al., 2011). Предполагают, что киназа MOL1 выполняет функции, противоположные TDR/PXY: по крайней мере, экспрессия именно гена *MOL1*, но не гена *TDR* в ПАМ приводит к восстановлению нормального фенотипа у мутанта *chl1*. Мутация *moll* подавляет экспрессию генов, задействованных в ответе на этилен и жасмоновую кислоту, которые играют роль во вторичном росте осевых органов (Gursansky et al., 2016). Лиганды и мишени для киназ ER, RUL и MOL в камбии не обнаружены.

Итак, в развитии камбия и ПС также важна система *WOX-CLAVATA*, включающая в себя CLE-пептиды группы В (TDIF), определенные CLE-пептиды группы А, рецепторные киназы TDR/PXY, ER и MOL и ТФ *WOX4* и *WOX14*. Точные функции в развитии ПС выявлены не для всех перечисленных компонентов: в настоящее время последовательность действия определена только в цепочке TDIF/CLE-В – TDR/PXY – *WOX4*, роль прочих регуляторов в этой системе и их взаимодействие еще предстоит изучить. В камбии, как и в других латеральных меристемах, не было обнаружено никаких аналогов организующего центра, препятствующих дифференцировке окружающих стволовых клеток. Тем не менее, несмотря на активную дифференцировку элементов ПС на периферии камбия, эта меристема способна к длительному поддержанию активности в течение всего жизненного цикла растений, в отличие от прочих латеральных меристем. Возможно, причина этого заключается в «нетрадицион-

ной» организации системы *WOX-CLAVATA*: в отличие от АМ, в камбии восприятие *CLE*-пептидов рецептором *TDR/PXY* приводит не к репрессии, а к активации гена *WOX4*.

Перицикл: практически неограниченные возможности

Перицикл – латеральная меристема, представленная одним или несколькими слоями недифференцированных клеток, окружающими стелу корня и иногда – стебля. Как и любая другая меристема, перицикл может поддерживать себя за счет пролиферации недифференцированных клеток, а также давать начало другим типам тканей. В качестве ЛМ перицикл функционирует недолго – в молодых осевых органах; позже в стебле и в верхней части корня клетки перицикла утрачивают способность к делению и полностью дифференцируются (Veeskman et al., 2001). Уникальной особенностью перицикла является способность давать начало не только специализированным типам тканей, таким как склеренхимные волокна, но и разнообразным типам меристем: апикальным (меристемы боковых корней (БК) и клубеньков), латеральным (камбий, феллоген), а также различным меристемоподобным структурам (калусы, опухоли) (Додуева и др., 2014). Несмотря на морфологическое единообразие перицикла, его клетки не идентичны функционально и делятся на два типа: клетки, прилежащие к ксилеме (ксилемный перицикл), которые обладают высокой способностью к клеточным делениям и используются для закладки других типов меристем, и клетки, прилежащие к флоэме (флоэмный перицикл), которые, как правило, не имеют этой способности (Parizot et al., 2008; Atta et al., 2009). Среди многочисленных ТФ, активных в корне, участие в регуляции развития перицикла было установлено только для ТФ *SHR* и *SCR* (Parizot et al., 2012). Ген *SHR* экспрессируется в клетках стелы, затем белок *SHR* перемещается в перицикл и эндодерму, где образует гетеродимер с ТФ *SCR*. Мишенью димера *SHR/SCR* служит ряд генов, экспрессирующихся в эндодерме и перицикле, в частности, сам ген *SCR* (Cui et al., 2011); ген, кодирующий микроРНК 165/166, которые регулируют уровень транскриптов генов *HD-ZIP3* (Emery et al., 2003); а также гены, регулирующие баланс ауксинов и ЦК в стеле (Okushima et al., 2005; Cui et al., 2011).

Генетический контроль поддержания и развития перицикла изучен значительно хуже, чем контроль развития других первичных меристем. Тем не менее в контроле развития перицикла участвует ряд регуляторов, характерных для КАМ, например ТФ *SCR* и *SHR*. По всей видимости, в перицикле не экспрессируются *WOX* гены, по крайней мере, у этой меристемы не выявлено «своего» гена *WOX*, определяющего ее идентичность. В то же время на ранних стадиях индукции других типов меристем из перицикла имеет место активация экспрессии *WOX* генов, как правило, *WOX5* (в БК, клубеньках, каллусе, спонтанных и патоген-индуцированных опухолях) (Gonzali et al., 2005; Atta et al., 2009; Osipova et al., 2012; Виноградова и др., 2015; Lebedeva et al., 2015), но иногда и других: *WUS* при регенерации побегообразованием (Atta et al., 2009), *WOX4* при закладке межпучкового камбия (Suer et al., 2011).

Способность перицикла к индукции БК и поддержанию меристематической активности в течение длительного времени после выхода из КАМ позволила выдвинуть предположение о функции перицикла как «расширенной апикальной меристеме корня» (De Smet et al., 2006). Гены, отвечающие за поддержание КАМ, такие как *WOX5* и *ACR4*, начинают экспрессироваться на самых ранних этапах развития примордия боковых корней, при первых асимметричных делениях клеток перицикла (Gonzali et al., 2005; Stahl et al., 2009). Закладка БК находится под сложным генетическим контролем, в основе которого лежит активация КАМ-специфичных ТФ под действием ауксина. Одной из мишеней действия индолилуксусной кислоты (ИУК) в клетках-основательницах БК служит ген *GATA23*, кодирующий ТФ: этот ген начинает экспрессироваться в клетках ксилемного перицикла перед их первым асимметричным антиклинальным делением – событием, с которым связывают момент инициации боковых корней. Снижение уровня транскрипта *GATA23* путем РНК-интерференции уменьшает число БК, что подтверждает необходимость этого ТФ для их закладки (De Rybel et al., 2010). В отличие от ауксинов, цитокинины подавляют образование БК, оказывая влияние на экспрессию генов *PIN*, кодирующих переносчики ауксинов. При этом ЦК регулируют расположение БК вдоль оси главного корня: показано, что в клетках перицикла, прилегающих к примордию БК, имеет место активация биосинтеза цитокининов, что не позволяет новым примордиям БК закладываться в непосредственной близости от «старого» (Chang et al., 2015).

Клетки ксилемного перицикла, компетентные к закладке БК, также играют первостепенную роль в процессах каллусогенеза и регенерации: во многом эти процессы сходны с процессом закладки БК, но отличаются по набором генов, экспрессия которых индуцируется в клетках перицикла при определенных условиях культивирования (Atta et al., 2009). Так, при культивировании корневых и гипокотильных эксплантов арабидопсиса на среде для индукции каллуса за счет деления клеток ксилемного перицикла на эксплантах формируются выросты, по своей морфологии сходные с примордиями БК. В этих структурах активируется ауксин-чувствительный промотор *DR5*, наблюдается экспрессия генов, характерных для БК: *WOX5*, *PLT1*, *SCR*, *SHR*, *GL2* и т.д. (Atta et al., 2009; Sugimoto et al., 2010). Перенос эксплантов на среду с ауксином вызывает завершение дифференцировки примордиев каллуса и превращение их в БК. При переносе же эксплантов на среду для индукции побегов (с повышенным содержанием ЦК) примордии каллуса превращаются в побеги – в них снижаются уровни экспрессии корнеспецифичных генов и начинают активироваться гены, характерные для ПАМ, такие как *WUS* и *STM*. Культивация корневых и гипокотильных эксплантов арабидопсиса на богатой ЦК среде для побегообразования (минуя среду для каллусогенеза) может приводить к прямой закладке побеговых меристем из клеток ксилемного перицикла (Atta et al., 2009).

Недавно показано, что сходные с каллусогенезом процессы происходят при образовании опухолей у растений, в частности опухолей на корнях инбредных линий

редиса (Lebedeva et al., 2015), корончатого галла, индуцированного *A. tumefaciens* (Виноградова и др., 2015), и корневых галлов, индуцированных паразитическими нематодами (De Almeida Engler, Gheysen, 2013). Так, при изучении механизмов агробактериальной трансформации растительных клеток установлено, что перенос и интеграция Т-ДНК в корневых эксплантах происходят преимущественно в клетки перидермы: частота успешной регенерации трансгенных растений при трансформации корневых эксплантов арабидопсиса *A. tumefaciens* составляет в среднем 0,5 %, тогда как доля трансформации и успешной регенерации трансгенных растений из клеток перидермы достигает 50 %, что свидетельствует о высокой компетенции клеток именно этой ЛМ к агробактериальной трансформации (De Buck et al., 2000). Ранние стадии развития спонтанных опухолей и корончатого галла морфологически и по распределению делящихся клеток сходны с ранними стадиями индукции БК и включают в себя формирование максимумов концентрации ауксинов и индукцию экспрессии гена *WOX5* (Виноградова и др., 2015; Lebedeva et al., 2015).

Кроме этого, перидерма участвует в формировании меристем симбиотических клубеньков при взаимодействии бобовых растений с ризобиями. Согласно наиболее распространенной гипотезе, клубеньки возникли в ходе эволюции на основе модификации программы развития боковых корней (Mathesius et al., 2000). Инициация клеточных делений при образовании примордиев клубеньков так же, как и при закладке примордиев БК, как правило, происходит в ксилемном перидерме. В системный контроль (авторегуляцию) развития клубеньков и БК могут быть вовлечены общие компоненты: у мутантов с повышенным количеством клубеньков (суперклубенькообразующих) также увеличено и число боковых корней (Searle et al., 2003). Другая особенность, сближающая клубеньки с БК, – наличие у него собственной меристемы. Показано, что важную роль в закладке и поддержании клубеньковых меристем играет ген *WOX5* – регулятор покоящегося центра КАМ (Осипова и др., 2011; Osipova et al., 2012), в меристеме клубеньков этот же ген служит мишенью системы авторегуляции клубенькообразования, включающей в себя определенные CLE-пептиды и их рецепторы (Mortier et al., 2010).

Каллусообразование и соматический эмбриогенез: творческий подход к размножению

Тотипотентность и высокая пластичность программ развития – давно известные особенности растительных клеток. Одним из следствий такой пластичности является способность растений продуцировать каллус – массу недифференцированных клеток, способных поэтому дать начало целому растению. Изначально каллусом называли растительную ткань, образующуюся на поверхности ран побегов или черенков в результате деления ближайших живых клеток, для такого раневого каллуса характерно накопление каллозы, откуда и пошло его название (Ikeuchi et al., 2013). В настоящее время этот термин применяют для обозначения любой недифференцированной массы растительных клеток, например, образование каллуса можно

индуцировать *in vitro* при культивировании эксплантов на среде, содержащей ауксины и цитокинины (Skoog, Miller, 1957). В соответствии с наличием или отсутствием признаков вторичной дифференцировки выделяют несколько типов каллуса: недифференцированный компактный; корнеобразующий (rooty callus, регенерирующий корни); побегообразующий (shooty callus, регенерирующий побеги); эмбрионный (embryonic callus, способный к СЭ) (Jiang et al., 2015).

Несмотря на длительное изучение, о молекулярных механизмах каллусообразования известно немного. Тем не менее исследователи сходятся во мнении, что каллус по сути представляет собой аномальную меристемоподобную ткань, способную давать начало нормальным меристемам (при регенерации побегов и корней из каллуса, при соматическом эмбриогенезе) (Ikeuchi et al., 2013; Jiang et al., 2015). В свою очередь, каллус часто индуцируется из существующих меристем, например, каллус на гипокотильных и корневых эксплантах арабидопсиса развивается из клеток ксилемного перидермы (Atta et al., 2009) или возникает за счет дедифференцировки клеток (Jiang et al., 2015).

В многочисленных исследованиях показано, что образование каллуса можно вызвать, манипулируя уровнями экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла, таких как *E2F* (*E2 PROMOTER BINDING FACTOR*) и *DP* (*DIMERIZATION PARTNER*), которые кодируют взаимодействующие ТФ, необходимые для контроля репликации ДНК (Kosugi, Ohashi, 2003), *KRP* (*KIP-RELATED PROTEIN*), кодирующие ингибиторы циклин-зависимых киназ (Anzola et al., 2010). Усиленное каллусообразование характерно также для линий со сверхэкспрессией генов, кодирующих необходимые для развития листа ТФ LBD (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN*) и ауксин-зависимые ТФ ARF7 и ARF19 (*AUXIN RESPONSE FACTOR7* и 19), мишенью действия которых служат вышеупомянутые гены E2F и DP (Okushima et al., 2007; Berckmans et al., 2011). В регуляции уровня белков KRP важную роль играет белок-транскрипционный адаптор PRZ1 (*PROPORZ1*); потеря его функции у мутанта арабидопсиса *prz1* вызывает спонтанное каллусообразование, сопровождающееся снижением уровней экспрессии генов KRP (Sieberer et al., 2003). В свою очередь, активация некоторых других ТФ вызывает спонтанный переход к соматическому эмбриогенезу и формирование эмбрионного каллуса (см. ниже).

Поимо нормального зиготического эмбриогенеза, для растений характерен соматический эмбриогенез – процесс, при котором незиготические клетки формируют эмбрионы, которые затем проходят через характерные стадии эмбрионального развития, в конечном итоге формируя новое растение (Chen et al., 2009). Многие виды растений хранят в себе потенциальную способность к СЭ, однако у большинства из них для образования соматических эмбрионов необходимы специфические условия *in vitro*, которые обычно включают в себя обработку гормонами и развитие эмбрионного каллуса. Соматический эмбриогенез имеет множество черт, присущих зиготическому эмбриогенезу (ЗЭ). В ходе развития соматического эмбриона обычно можно различить морфологические стадии, ха-

раактерные для развития эмбриона из зиготы (Zimmerman, 1993). В частности, важным этапом СЭ является закладка пулов стволовых клеток первичных меристем – ПАМ, КАМ и прокамбия. Необходимое условие нормального морфогенеза зародыша при ЗЭ и СЭ – создание локальных максимумов концентрации ауксина, которые возникают благодаря активности белков полярного транспорта ауксинов PIN; в частности, показано участие гена *PIN1* и его гомологов в СЭ у *A. thaliana* (Su et al., 2009) и *Picea abies* (Palovaara et al., 2010).

Установлено, что большое количество генов, работающих в ходе СЭ, функционирует и при зиготическом эмбриогенезе. Среди них, например, гены, кодирующие ТФ разных групп: LEC1 (LEAFY COTYLEDON1) (Lotan et al., 1998), LEC2 (LEAFY COTYLEDON2) и FUS3 (FUSCA3), BABY BOOM (Boutillier et al., 2002), AGAMOUS-LIKE15 (Zheng et al., 2013). В число регуляторов СЭ также входят рецепторная киназа SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) из семейства LRR-RLK (Santiago et al., 2013); точные функции ее в СЭ не выяснены.

К числу общих регуляторов СЭ и ЗЭ можно также отнести ТФ семейства WOX. У арабидопсиса на самых ранних стадиях ЗЭ функционируют ТФ WOX2, WOX8 и WOX9, которые определяют первичную «разметку» зародыша; на более поздних стадиях в клетках, которые впоследствии дадут начало ПАМ и КАМ, экспрессируются гены *WUS* и *WOX5* (Haecker et al., 2004). Вполне вероятно, что в контроле СЭ участвуют те же транскрипционные факторы. Так, исследование СЭ у винограда показало, что практически все гены *WOX* у этого вида экспрессируются в ходе каллусообразования, при этом экспрессия некоторых из них ассоциирована с немэмбриогенными каллусами, а другие экспрессируются как раз в ходе соматического эмбриогенеза. У арабидопсиса экспрессия гена *WUS* служит маркером и стимулятором СЭ и участвует в закладке ПАМ у соматических зародышей (Chen et al., 2009; Su et al., 2015); ген *WOX5*, в свою очередь, участвует в закладке КАМ соматических зародышей (Su et al., 2015). На разных видах растений показано, что в соматических зародышах также экспрессируются гомологи генов *WOX2* (Gambino et al., 2011; Klimaszewska et al., 2011; Rupps et al., 2016) и *WOX9* (Kurdyukov et al., 2014). Гомологи генов *WOX1* и *WOX3*, функционирующих в ходе развития листа, активируются на поздних стадиях СЭ у *Vitis vinifera* (Gambino et al., 2011). Экспрессия в ходе каллусообразования и/или СЭ у разных видов растений отмечена также для генов *WOX11*, *12* и *13* (Gambino et al., 2011; Liu et al., 2014).

Галлы и опухоли: меристемы под ключ – заселение сегодня

Для образования опухолей у растений характерно повышение количества (гиперплазия) и размера (гипертрофия) клеток. Часто у растений выделяют собственно опухоли (каллусоподобные структуры с неограниченным ростом и слабо выраженными признаками вторичной дифференцировки, как правило, способные к гормон-независимому росту при изоляции от растения) и галлы (ограниченно растущие структуры, состоящие в основном из дифференцированных тканей, неспособных к самоподдержанию) (Dodueva et al., 2007). Встречаются спонтанные

опухоли, возникающие у растений с определенным генотипом, и патоген-индуцированные, развивающиеся под влиянием паразитов, как правило, за счет изменения гормонального баланса в тканях растения под влиянием паразита. Большая часть индуцированных опухолей – это структурированные, ограниченно растущие галлы; большая часть спонтанных – это типичные опухоли. Классический пример спонтанных опухолей представляют опухоли у мутантов арабидопсиса с нарушенной клеточной адгезией (*tsd*, *pas*, *prz*) (Frank et al., 2002; Sieberer et al., 2003; Krupková, Schmülling, 2009), у трансгенных растений со сверхэкспрессией CHRК-киназы, точные функции которой в контроле деления клеток неизвестны (Lee et al., 2004), а также у инбредных линий, в частности опухолевых линий редиса (Бузовкина, Лутова, 2007). Патоген-индуцированные опухоли могут быть вызваны бактериями, грибами, нематодами, простейшими, членистоногими. Промежуточное положение занимают опухолевые межвидовые гибриды табака: с одной стороны, это спонтанные опухоли, с другой – для их индукции нужна экспрессия последовательностей, полученных некоторыми из родительских видов от агробактерий в результате горизонтального переноса генов (Intrieri, Buiatti, 2001).

Индукция галлов и опухолей на растении-хозяине – один из оригинальных способов колонизации растений биотрофными патогенами, при котором аномальное разрастание растительных тканей создает для патогена хорошо защищенную среду обитания с доступным источником пищи. Все это достигается «репрограммированием» зараженных растительных клеток под действием сигналов, поступающих от патогена. Как правило, такими сигналами служат фитогормоны, способность к синтезу и секреции которых составляет характерную особенность опухоль-индуцирующих организмов. Результатом такого репрограммирования становится создание пула делящихся недифференцированных клеток (фактически – новой меристемы), который заселяется патогеном и затем в той или иной степени приобретает черты вторичной дифференцировки. Рядом исследователей показано сходство опухолей с нормальными меристемами на основе гистологического строения (Ullrich, Aloni, 2000; Виноградова и др., 2015; Lebedeva et al., 2015) и экспрессии генов меристемных регуляторов (Лутова и др., 2008; Testone et al., 2008; Виноградова и др., 2015; Lebedeva et al., 2015). Интересно, что некоторые изученные типы опухолей растений происходят из перицикла – плюрипотентной латеральной меристемы (De Buck et al., 2000; Lebedeva et al., 2015).

Наиболее изученный опухоль-индуцирующий фитопатоген – возбудитель корончатого галла *Agrobacterium tumefaciens* – вызывает встраивание в геном растений Т-ДНК, участка плазмиды, содержащего гены биосинтеза опинов и гены фитогормонального метаболизма. Экспрессия последних приводит к формированию опухоли, известной под названием «корончатый галл», у широкого круга видов растений (Garfinkel et al., 1981). Корончатый галл представляет собой типичную опухоль, которая характеризуется быстрой пролиферацией клеток, способностью к гормон-независимому росту и полной потерей способности к регенерации (Ahuja, 1998). Мо-

лодой корончатый галл возникает как недифференцированная масса клеток, в дальнейшем может происходить вторичная дифференцировка некоторых типов тканей, например покровных и флоэмы (Ullrich, Aloni, 2000; Veselov et al., 2003). Гистологический анализ опухолей, индуцированных *A. tumefaciens* на горохе, позволил выявить в них меристематические структуры, внешне напоминающие КАМ и содержащие мелкие клетки с плотной цитоплазмой. Анализ распределения пролиферирующих клеток в опухолях с помощью меченого аналога тимидина 5-этинил-2-дезоксинуридина, показал, что пролиферирующие клетки в опухолях сосредоточены в таких меристемоподобных структурах (Виноградова и др., 2015).

Известны еще несколько видов галлообразующих бактерий – *Pseudomonas savastanoi*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodococcus fascians*, которые вызывают формирование галлов с ограниченным ростом. Индукция галлов этими бактериями также тесно связана с их способностью к биосинтезу ЦК и ауксинов, которая определяется плазмидными или хромосомными генами; гены биосинтеза фитогормонов у галлообразующих бактерий демонстрируют высокий уровень структурного и функционального сходства друг с другом и с генами *A. tumefaciens*, но не способны встраиваться в геном хозяина (Glass, Kosuge, 1988; Vandeputte et al., 2005; Chalupowicz et al., 2009).

К индукции опухолевого роста у растений также приводит заражение некоторыми видами фитопатогенных грибов, среди них наиболее изучены головневые грибы порядка Ustilaginales: например, *Ustilago maydis* вызывает образование опухолей на початках кукурузы, *U. esculenta* образует крупные «съедобные галлы» на злаке *Zizania latifolia* (Chung, Tzeng, 2004). Многие грибы, паразитирующие на растениях (не только галлообразующие), способны к биосинтезу и секреции фитогормонов (Chung, Tzeng, 2004). Так, у *U. maydis* были идентифицированы гены *iad1* и *iad2*, кодирующие ферменты биосинтеза ИУК (Reineke et al., 2008). У спорыньи (*Claviceps purpurea*) идентифицирован уникальный ген биосинтеза цитокининов *SpIPT-LOG*, который кодирует гибридный фермент, объединяющий в себе функциональные домены белков IPT и LOG, катализирующих два последовательных этапа биосинтеза цитокининов (Hinsch et al., 2015). Способностью к секреции ИУК и ЦК обладает также опухоль-индуцирующее простейшее *Plasmodiophora brassica* – возбудитель капустной килы (Devos et al., 2006), а также ряд галлоиндуцирующих членистоногих – клещей (De Lillo, Monfreda, 2004) и насекомых (Tooker, Helms, 2014). Тем не менее гены, регулирующие биосинтез ауксинов и ЦК, у этих фитопаразитов пока не обнаружены. Некоторые исследователи считают, что синтез фитогормонов у этих организмов осуществляется симбиотическими бактериями (Giron, Glevages, 2014). Повышение содержания эндогенных фитогормонов, в особенности ИУК и ЦК, было показано также для спонтанных опухолей разных типов (Ahuja, 1998; Matveeva et al., 2004; Lee et al., 2004).

Возможной мишенью действия ауксинов и ЦК при индукции опухолей становятся гены, кодирующие меристем-специфичные транскрипционные факторы. Так, при заражении растений паразитическим грибом *Taphrina deformans*, вызывающим болезнь курчавых листьев персика

и сливы, имеет место активация экспрессии гена *KNOPE1*, ортолога гена *KNAT1* арабидопсиса, причем зоны его экспрессии совпадают с участками пролиферации клеток палисадной паренхимы (Testone et al., 2008). Активация экспрессии гена *RsKNAT1* отмечена также при развитии спонтанных опухолей на корнях инбредных линий редиса (Лутова и др., 2008). Недавно было показано, что при росте корончатого галла на горохе имеет место активация экспрессии гена *WOX5* (Виноградова и др., 2015). В спонтанных опухолях у инбредных линий редиса также имеет место активация экспрессии *WOX5*, причем экспрессия этого гена сосредоточена в зонах пролиферации клеток и прилегает к максимумам концентрации ауксина (Lebedeva et al., 2015). Еще один меристем-специфичный ген, активирующийся при развитии опухолей, – *SHR*, активация экспрессии которого обнаружена в опухолях, индуцированных агробактерией (Виноградова и др., 2015).

Несколько иная стратегия индукции опухолей на растении-хозяине свойственна нематодам родов *Globodera*, *Heterodera* и *Meloidogyne*, паразитирующим на корнях. Образование таких опухолей индуцируется при впрыскивании в ткани корня секрета глоточных желез нематоды, который содержит белки, очень сходные с растительными CLE-пептидами (Wang et al., 2005; Huang et al., 2006). Некоторые CLE-пептиды нематод идеально «мимикрируют» под CLE-пептиды растений. Например, CLE-домен пептида HsCLE2 *Heterodera schachtii* идентичен таковому у корнеспецифичных пептидов AtCLE5 и AtCLE6 арабидопсиса (Wang et al., 2011). Установлено, что «нематодные» CLE-пептиды, наряду с «растительными», проходят пост-трансляционную модификацию в растительной клетке (Chen et al., 2015) и взаимодействуют с одним из растительных рецепторов CLE-пептидов – CLV2/CRN (Replogle et al., 2011). О высоком функциональном сходстве «нематодных» и «растительных» CLE-пептидов свидетельствует выявленная у ряда «нематодных» CLE способность комплементировать мутацию *clv3* у арабидопсиса (Lu et al., 2009). Вместе с тем CLE-пептиды могут участвовать в развитии других типов опухолей. Так, активация экспрессии гена *CLE41*, кодирующего CLE-пептид, необходимый для поддержания камбия, выявлена при изучении транскриптома опухолей, индуцированных агробактерией (А.А. Ткаченко, устное сообщение).

Меристемы клубеньков: совместное предприятие по разработке природных ресурсов

К вторичным меристемам, которые формируются *de novo* при определенных условиях, можно отнести меристемы специализированных органов, таких как азотфиксирующие клубеньки, образующиеся на корнях бобовых растений при симбиозе с бактериями-ризобиями. Клубеньки образуются в результате сигнального обмена между растением-хозяином, выделяющим флавоноиды, и ризобиями, секретирующими сигнальные молекулы липохитоолигосахаридной природы Nod-факторы. Восприятие бактериальных сигнальных молекул растением вызывает ряд морфологических и физиологических изменений в корневых волосках, за счет чего становится возможной бактериальная колонизация растения-хозяина.

Одновременно с этим Nod-факторы дистанционно стимулируют клетки перицикла, вызывая в них перестройку цитоскелета и пролиферацию клеток ксилемного перицикла и прилежащих к ним клеток коры (Timmers et al., 1999). У бобовых растений с недетерминированным типом клубеньков из клеток перицикла закладывается самоподдерживающаяся меристема, благодаря активности которой продолжается рост клубенька (Crespi, Frugier, 2008).

У бобовых растений существует так называемая система авторегуляции клубенькообразования (англ. autoregulation of nodulation, AON), осуществляющая системный контроль развития клубеньков на уровне целого организма. AON представляет собой механизм, посредством которого растение ингибирует дальнейшее формирование клубеньков на корнях после того, как уже образовались несколько первых клубеньков. В AON у всех изученных бобовых вовлечена CLV1-подобная рецепторная киназа (Ока-Кига, Kawaguchi, 2006); мутации в гене CLV1-подобной киназы (*MtSUNN Medicago truncatula/ LjHAR1 Lotus japonicus/ PsSYM29 Pisum sativum/ GmNARK Glicine max*), приводят к суперклубенькообразующему фенотипу (Searle et al., 2003; Schnabel et al., 2005; Okamoto et al., 2009). Как показали эксперименты с прививками, суперклубенькообразующий фенотип таких мутантов определяется побеговой частью растения, таким образом, CLV1-подобная киназа, вовлеченная в AON, функционирует в побеге. AON инициируется в ходе развития клубеньков синтезом сигнала, поступающего из корней (так называемый сигнал 'Q'), который представляет собой CLE-пептиды: у модельных бобовых растений (*M. truncatula, L. japonicus*) были выявлены CLE гены (*MtCLE13, LjCLE-RS1, LjCLE-RS2*), экспрессия которых специфично активируется при клубенькообразовании (Okamoto et al., 2009; Mortier et al., 2010). Сверхэкспрессия таких CLE генов приводила к системному подавлению клубенькообразования у растений дикого типа, но не у суперклубенькообразующих мутантов с потерей функции CLV1-подобного рецептора *LjHAR1/ MtSUNN/ PsSYM29* (Okamoto et al., 2009; Mortier et al., 2010; Osipova et al., 2012). На основании таких данных предполагают, что CLE пептиды *MtCLE13, LjCLE-RS1, LjCLE-RS2* являются лигандами LRR-RLK, вовлеченных в AON, однако к настоящему времени перемещение этих CLE-пептидов из корней в наземную часть растений не было подтверждено. Восприятие поступивших из клубенька CLE-пептидов локализованной в листьях CLV1-подобной киназой, по-видимому, приводит к формированию нового сигнала, поступающего из побега и подавляющего развитие клубеньков, однако его природа не идентифицирована.

Мишенью сигнального пути, индуцируемого CLE-пептидами в AON, служит ген *WOX5*. Экспрессия этого гена индуцируется при закладке клубенька и в дальнейшем сохраняется на ранних стадиях его развития в клубеньковой меристеме. У суперклубенькообразующего мутанта люцерны *sunn* с потерей функции CLV1-подобного рецептора, участвующего в AON, наблюдается повышенный уровень экспрессии *MtWOX5*, и зона экспрессии этого гена значительно расширена (Осипова и др., 2011; Osipova et al., 2012). Ген *WOX5* в меристеме клубенька, так же, как и в КАМ, активируется ауксином. По-видимому,

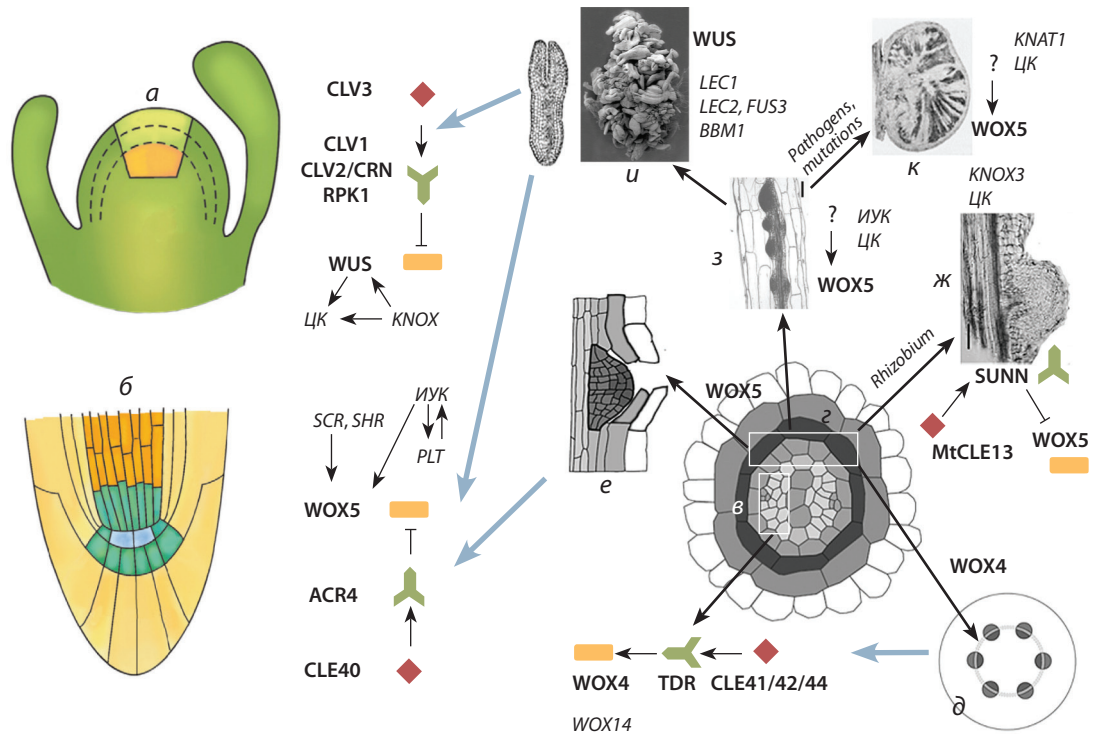
накопление ауксина в клубеньке также контролируется механизмами AON: так, у мутанта *har1* с нарушением в гене CLV1-подобного рецептора, вовлеченного в AON, расширена зона с повышенным содержанием ауксина в кортикальных клетках (Suzaki et al., 2012).

Другой важный регулятор развития меристемы клубенька, помимо взаимодействующей с ауксином системы WOX-CLAVATA, лежащей в основе AON, – цитокинины и взаимодействующие с ними ТФ KNOX. Потеря функции цитокининовых рецепторов у мутантов *L. japonicus* и *M. truncatula* приводит к подавлению клубенькообразования. В то же время при развитии клубеньков у разных видов бобовых выявлена активация транскрипции генов, кодирующих компоненты передачи сигнала цитокининов – регуляторов ответа (RR) А и В типов (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Plet et al., 2011; Azarakhsh et al., 2015). Была установлена роль белков *MtRR1* (RR В-типа) и *MtRR4* (RR А-типа) в качестве позитивного и негативного регуляторов клубенькообразования, соответственно (Op den Camp et al., 2011; Ariel et al., 2012), причем ТФ *MtRR1* непосредственно контролирует экспрессию гена *MtRR4*, образуя негативную обратную связь в этой системе (Ariel et al., 2012). Недавно показано, что в ответ на инокуляцию ризобиями в перицикле корня гороха и люцерны имеет место активация экспрессии определенных генов, регулирующих два последовательных этапа биосинтеза ЦК, – *IPT* и *LOG* (Azarakhsh et al., 2015). Сходная динамика экспрессии была отмечена для генов *MtKNOX3* и *PsKNOX3*, кодирующих гомеодомен-содержащие ТФ KNOX класса II. Более того, сверхэкспрессия генов *KNOX3* приводит к образованию спонтанных клубеньков без инокуляции ризобиями, что свидетельствует о роли ТФ KNOX3 как важнейшего регулятора развития клубеньков. Поскольку в ПАМ гены *IPT* и *LOG* служат прямыми мишенями ТФ семейства KNOX (Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005), вероятно, что ТФ KNOX3 могут быть вовлечены в активацию цитокининового ответа в меристеме клубенька. Действительно, сверхэкспрессия *MtKNOX3* приводит к активации экспрессии генов *MtLOG2* и *MtIPT3* в «пустых» клубеньках, спонтанно развивающихся на корнях, а РНК-интерференция этого гена – к значительному снижению уровней их экспрессии (Azarakhsh et al., 2015).

Заключение

Итак, в настоящее время выявлены механизмы поддержания СК в разных типах меристем. Как легко убедиться, наиболее консервативны из них механизмы, которые зависят от систем WOX-CLAVATA. Их работа поддерживает определенное количество клеток в меристемах, а также баланс пролиферации и дифференцировки СК. Роль систем WOX-CLAVATA и других регуляторов развития в поддержании разных типов меристем представлена на рисунке.

Ранее считалось, что гены *WOX* обуславливают также идентичность меристем. Действительно, эктопическая экспрессия гена *WUS* в корнях трансгенных растений приводила к формированию на кончиках корней зеленых листоподобных структур, содержащих специфичные для листьев типы клеток (трихомы, клетки устьиц); у ряда растений происходило формирование на кончике корня



Системы WOX-CLAVATA и другие регуляторы разных типов меристем.

a – в побеговой апикальной меристеме (ПАМ) экспрессия гена *WUS* в организующем центре негативно регулируется пептидом *CLV3* при его связывании с рецепторными протеинкиназами *CLV1*, *CLV2/CRN* и *RPK1*; транскрипционные факторы *KNOX* и цитокинины необходимы для закладки ПАМ в эмбриогенезе и поддержания пролиферации ее клеток в постэмбриональном развитии; *б* – в корневой апикальной меристеме (КАМ) экспрессия гена *WOX5* в организующем центре негативно регулируется пептидом *CLE40* при его связывании с рецепторной протеинкиназой *ACR4*; для закладки организующего центра КАМ необходимы ауксины и активность транскрипционных факторов *SCR* и *SHR*, транскрипционные факторы *PLT* необходимы для создания локального максимума концентрации ауксинов; *в* – в прокамии (а затем в камбии) экспрессия гена *WOX4* позитивно регулируется пептидами *CLE41/42/44* при их связывании с рецепторной протеинкиназой *TDR*. *г* – в перичикле не экспрессируются «собственные» *WOX* гены, но при определенных условиях и при индукции экспрессии определенных генов *WOX* он может давать начало разным типам меристем: *д* – межпучковому камбию (в котором экспрессируется *WOX4*); *е* – боковым корням (которые регулируются системой *CLE40-ACR4-WOX5*); *ж* – меристемам симбиотических клубеньков (которые у люцерны регулируются специфичным для клубеньков пептидом *CLE13*, его рецептором *SUNN*, работающим в листьях, и геном *WOX5*); *з* – примордиям каллуса, в которых экспрессируется *WOX5* и которые могут дать начало соматическим эмбрионам, например, при экспрессии *WUS* (*u*), или опухолям, в которых также экспрессируется *WOX5* (*к*).

◆ – CLE-пептид; Y – Рецептор CLE-пептидов; □ – ТФ WOX; WOX5 – компоненты систем WOX-CLAVATA; KNOX – другие регуляторы.

зеленого каллуса, содержащего дифференцирующиеся эмбриониды (Gallois et al., 2004). Но в то же время «взаимозаменяемость» *WOX5* и *WUS*, продемонстрированная в опытах А.К. Sarkar с коллегами (2007), а также активность *WOX5* в разнообразных типах меристем «корневого» происхождения (КАМ, каллус, опухоли, клубеньки) не подтверждают эту точку зрения. Можно высказать спекулятивное предположение о том, что гены *WOX* определяют идентичность не каждого типа меристем, а целой их группы. Например, на три больших группы можно разделить все вышеперечисленные меристемы:

Апикальные меристемы (ПАМ, КАМ) и похожие на них (клубеньковые меристемы, опухоли, примордии каллуса). Характерная особенность АМ и близких к ним меристем – наличие либо четко организованных ОЦ, либо хотя бы локализованных компактных групп стволовых клеток. Регулируются они близкими генами

WUS и *WOX5*, которые в эволюции разделились сравнительно недавно (Nardmann et al., 2009). Наличие ОЦ или сходных с ними структур, в которых экспрессируются *WUS/WOX5*, обеспечивает АМ долгую жизнь, но, как только экспрессия *WUS/WOX5* прекращается, весь запас СК такой АМ дифференцируется в специализированные клетки, и она прекращает существование.

Латеральные меристемы (прокамбий, камбий). Их особенность – отсутствие ОЦ или чего-то на них похожего. Пул СК в ЛМ представляет собой очень протяженную и однородную группу (слой); долговременная жизнь таких меристем определяется не сохранением «ядра» (ОЦ), как в АМ, а другим принципом регуляции: система *CLAVATA*, работающая в ЛМ, не ограничивает, а поддерживает стволовые клетки. Регулятор ЛМ, *WOX4*, отличается от других *WOX* той же ветви и не может комплементировать потерю их функции (Dolzblasz et al., 2016).

«Неопределенные» или временные меристемы – те, в которых отсутствует экспрессия генов *WOX*. Эти меристемы живут недолго (недифференцированный компактный каллус, раневой каллус, перидикл), затем они либо гибнут, либо тратят свой запас СК, либо в них начинается экспрессия *WOX*, и они превращаются в какой-либо из типов «долгоживущих» меристем. Яркий пример – перидикл, который может давать начало ПАМ регенерирующих побегов (при индукции экспрессии *WUS*); КАМ примордиев БК, меристемы клубеньков, опухоли (при активации *WOX5*), межпучковому камбию (для этого надо начать экспрессировать *WOX4*).

Разные варианты развития меристем в пределах группы могут определяться другими ТФ, фитогормонами, другими регуляторами, которые очень различаются в разных меристемах. Например, ПАМ регулируется цитокининами и *KNOX*, а КАМ – ауксинами, *PLT* и *SCR/SHR*, хотя принцип устройства систем *WOX-CLAVATA* у них почти одинаков.

Благодарности

Исследование механизмов поддержания стволовых клеток растений проводится при поддержке грантов РФФИ 15-34-20071, 15-29-02737, 14-04-00591 и РНФ 16-16-10011.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Бузовкина И.С., Лутова Л.А. Генетическая коллекция инбредных линий редиса: история и перспективы. *Генетика*. 2007;4: 1411-1423.

Виноградова А.П., Лебедева М.А., Лутова Л.А. Меристематические характеристики опухолей, индуцированных *Agrobacterium tumefaciens* у гороха. *Генетика*. 2015;51(1):54-62.

Додуева И.Е., Ганчева М.С., Осипова М.А., Творогова В.Е., Лутова Л.А. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль. *Физиология растений*. 2014; 61(5):611-631.

Иванов В.Б. Проблема стволовых клеток у растений. *Онтогенез*. 2003;34(4):243-261.

Иванов В.Б. Стволовые клетки в корне и проблема стволовых клеток у растений. *Онтогенез*. 2007;38(6):406-419.

Лутова Л.А., Долгих Е.А., Додуева И.Е., Осипова М.А., Ильина Е.Л. Изучение системного контроля деления и дифференцировки клеток растений на примере опухолевого роста у редиса. *Генетика*. 2008;44(8):1075-1083.

Осипова М.А., Долгих Е.А., Лутова Л.А. Особенности экспрессии меристем-специфичного гена *WOX5* при органогенезе клубеньков бобовых растений. *Онтогенез*. 2011;42(4):264-275.

Agusti J., Lichtenberger R., Schwarz M., Nehlin L., Greb T. Characterization of transcriptome remodeling during cambium formation identifies *MOL1* and *RUL1* as opposing regulators of secondary growth. *PLoS Genet*. 2011;7(2):e1001312. DOI 10.1371/journal.pgen.1001312.

Ahuja M.R. Genetic tumors in Nicotiana and other plants. *Quart. Rev. Biol.* 1998;73:439-459.

Anzola J.M., Sieberer T., Ortbauer M., Butt H., Korbei B., Weinhofer I., Müllner A.E., Luschnig C. Putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein (*PROPORZ1*) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(22):10308-10313. DOI 10.1073/pnas.0913918107.

Ariel F., Brault-Hernandez M., Laffont C., Huault E., Brault M., Plet J., Moison M., Blanchet S., Ichanté J.L., Chabaud M., Carrere S., Cres-

pi M., Chan R.L., Frugier F. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Online*. 2012;24(9):3838-3852. DOI 10.1105/tpc.112.103267.

Atta R., Laurens L., Boucheron-Dubuisson E., Guivarc'h A., Carneiro E., Giraudat-Pautot V., Rech P., Chriqui D. Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shootregeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *Plant J*. 2009;57(4):626-644. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03715.x.

Azaraksh M., Kirienko A.N., Zhukov V.A., Lebedeva M.A., Dolgikh E.A., Lutova L.A. *KNOTTED1-LIKE HOMEBOX 3*: a new regulator of symbiotic nodule development. *J. Exp. Bot.* 2015; 66(22):7181-7195. DOI 10.1093/jxb/erv414.

Beeckman T., Burssens S., Inzé D. The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 2001;52:403-411.

Belles-Boix E., Hamant O., Witiak S.M., Morin H., Traas J., Pautot V. *KNAT6*: an Arabidopsis homeobox gene involved in meristem activity and organ separation. *Plant Cell*. 2006;18(8):1900-1907.

Berkmans B., Vassileva V., Schmid S.P., Maes S., Parizot B., Naramoto S., Magyar Z., Alvim Kamei C.L., Koncz C., Bögre L., Persiau G., De Jaeger G., Friml J., Simon R., Beeckman T., De Veylder L. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis *E2Fa* by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell*. 2011;23(10):3671-3683. DOI 10.1105/tpc.111.088377.

Betsuyaku S., Takahashi F., Kinoshita A., Miwa H., Shinozaki K., Fukuda H., Sawa S. Mitogen-activated protein kinase regulated by the *CLAVATA* receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol*. 2011;52:14-29. DOI 10.1093/pcp/pcq157.

Bishopp A., Help H., El-Showk S., Weijers D., Scheres B., Friml J., Benková E., Mähönen A.P., Helariutta Y. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Curr. Biol*. 2011a;21:917-926. DOI 10.1016/j.cub.2011.04.017.

Bishopp A., Lehesranta S., Vaten A., Help H., El-Showk S., Scheres B., Helariutta K., Mähönen A.P., Sakakibara H., Helariutta Y. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Curr. Biol*. 2011b;21(11): 927-932.

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemssen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*. 2005;433:39-44.

Boutillier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.-M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B., van Lookeren Campagne M.M. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*. 2002;14:1737-1749.

Breuninger H., Rikirsch E., Hermann M., Ueda M., Laux T. Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the Arabidopsis embryo. *Dev. Cell*. 2008;14:867-876. DOI 10.1016/j.devcel.2008.03.008.

Busch W., Miotk A., Ariel F.D., Zhao Z., Forner J., Daum G., Suzuki T., Schuster C., Schultheiss S.J., Leibfried A., Haubeiss S., Ha N., Chan R.L., Lohmann J.U. Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev. Cell*. 2010;18(5):849-61.

Carlsbecker A., Lee J.Y., Roberts C.J., Dettmer J., Lehesranta S., Zhou J., Lindgren O., Moreno-Risueno M.A., Vaten A., Thitamadee S. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*. 2010;465:316-321. DOI 10.1038/nature08977.

Chalupowicz L., Barash I., Panijel M., Sessa G., Manulis-Sasson S. Regulatory interactions between quorum-sensing, auxin, cytokinin, and the Hrp regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant Microbe Interaction*. 2009;22:849-856. DOI 10.1094/MPMI-22-7-0849.

Chang L., Ramireddy E., Schmülling T. Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 2015; 66(15):4759-4768. DOI 10.1093/jxb/erv252.

Chen S.-K., Kurdyukov S., Kereszt A., Wang X.-D., Gresshoff P.M., Rose R.J. The association of homeobox gene expression with stem

- cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula*. *Planta*. 2009;230:827-840. DOI 10.1007/s00425-009-0988-1.
- Chen S., Lang P., Chronis D., Zhang S., De Jong W.S., Mitchum M.G., Wang X. In planta processing and glycosylation of a nematode CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION-like effector and its interaction with a host CLAVATA2-like receptor to promote parasitism. *Plant Physiol*. 2015;167(1):262-272. DOI 10.1104/pp.114.251637.
- Chuck C., Lincoln C., Hake S. KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1996; 8:1277-1289.
- Chung K.R., Tzeng D.D. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. *J. Biol. Sci.* 2004;4:744-750. DOI 10.3923/jbs.2004.744.750.
- Crespi M., Frugier F. *De novo* organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci. Signal*. 2008;1(49). DOI 10.1126/scisignal.149re11.
- Cruz-Ramírez A., Díaz-Triviño S., Wachsman G., Du Y., Arteaga-Vázquez M., Zhang H., Benjamins R., Blilou I., Neef A.B., Chandler V., Scheres B. A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. *PLoS Biol*. 2013;11(11):e1001724. DOI 10.1371/journal.pbio.1001724. DOI 10.1371/journal.pbio.1001724.
- Cui H., Hao Y., Kovtun M., Stolz V., Deng X.W., Sakakibara H., Kojima M. Genome-wide direct target analysis reveals a role for SHORT-ROOT in root vascular patterning through cytokinin homeostasis. *Plant Physiol*. 2011;157:1221-1231. DOI 10.1104/pp.111.183178.
- De Almeida Engler J., Gheysen G. Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? *Mol. Plant Microbe Interact*. 2013;6:17-24. DOI 10.1094/MPMI-05-12-0128-CR.
- De Buck S., De Wilde C., Van Montagu M., Depicker A. Determination of the T-DNA transfer and the T-DNA integration frequencies upon cocultivation of *Arabidopsis thaliana* root explants. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2000;13:658-665.
- De Lillo E., Monfreda R. Salivary secretions' of eriophyoids (Acari: Eriophyoidea): first results of an experimental model. *Exp. Appl. Acarol*. 2004;34(3-4):291-306.
- De Rybel B., Vassileva V., Parizot B., Demeulenaere M., Grunewald W., Audenaert D., Van Campenhout J., Overvoorde P., Jansen L., Vanneste S., Möller B., Wilson M., Holman T., Van Isterdael G., Brunoud G., Vuylsteke M., Vernoux T., De Veylder L., Inzé D., Weijers D., Bennett M.J., Beeckman T. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol*. 2010;20:1697-1706. DOI 10.1016/j.cub.2010.09.007.
- De Smet I., Vanneste S., Inzé D., Beeckman T. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol*. 2006;60:871-887.
- Devos S., Laukens K., Deckers P., Van Der Straeten D., Beeckman T., Inzé D., Van Onckelen H., Witters E., Prinsen E. A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmiodiophora brassicae* infection on Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2006;19:1431-1443.
- Dodueva I.E., Frolova N.V., Lutova L.A. Plant tumorigenesis: different ways for shifting systemic control of plant cell division and differentiation. *Transgen. Plant J*. 2007;1:3-24.
- Dolzblasz A., Nardmann J., Clerici E., Causier B., van der Graaff E., Chen J., Davies B., Werr W., Laux T. *Mol. Plant*. 2016; pii: S1674-2052(16)30029-6. DOI 10.1016/j.molp.2016.04.007.
- Dubrovsky J.G., Doerner P.W., Colón-Carmona A., Rost T.L. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2000;124:1648-1657.
- Emery J.F., Floyd S.K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N.P., Izhaki A., Baum S.F., Bowman J.L. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr. Biol*. 2003;13:1768-1774.
- Etchells J.P., Provost C.M., Mishra L., Turner S.R. WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organization. *Development*. 2013;140:2224-2234. DOI 10.1242/dev.091314.
- Etchells J.P., Provost C.M., Turner S.R. Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signalling. *PLoS Gen*. 2012;8(11):e1002997.
- Etchells J.P., Turner S.R. The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development*. 2010;137:767-774. DOI 10.1242/dev.044941.
- Feldman L.J. The de novo Origin of the Quiescent Center Regenerating Root Apices in Zea mays. *Planta*. 1976;128(3):207-212. DOI 10.1007/BF00393230.
- Fiers M., Hause G., Boutilier K., Casamitjana-Martinez E., Weijers D., Offringa R., van der Geest L., van Lookeren Campagne M., Liu C.M. Mis-expression of the CLV3/ESR-like gene CLE19 in Arabidopsis leads to a consumption of root meristem. *Gene*. 2004;327(1): 37-49.
- Fisher K., Turner S. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr. Biol*. 2007;17:1061-1066.
- Frank M., Guiv'Arch A., Krupkova E., Lorenz-Meyer I., Chriqui D., Schmullig T. TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *Plant J*. 2002;29:73-85.
- Gagne J.M., Clark S.E. The Arabidopsis stem cell factor POLTER-GEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *Plant Cell*. 2010;22:729-743. DOI 10.1105/tpc.109.068734.
- Gallois J.-L., Nora F.R., Mizukami Y., Sablowski R. WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Gen. Dev*. 2004;18:375-380.
- Gambino G., Minuto M., Boccacci P., Perrone I., Vallania R., Grubaud I. Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot*. 2011;62:1089-1101. DOI 10.1093/jxb/erq349.
- Garfinkel D.J., Simpson R.B., Ream L.W., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell*. 1981;27(1 Pt 2): 143-153.
- Giron D., Glevarec G. Cytokinin-induced phenotypes in plant-insect interactions: learning from the bacterial world. *J. Chem. Ecol*. 2014;40(7):826-835. DOI 10.1007/s10886-014-0466-5.
- Glass N.L., Kosuge T. Role of indoleacetic acid-lysine synthetase in regulation of indoleacetic acid pool size and virulence of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *J. Bacteriol*. 1988;170(5): 2367-2373.
- Gonzalez-Rizzo S., Crespi M., Frugier F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell Online*. 2006;18(10):2680-2693.
- Gonzali S., Novi G., Loreti E., Paolicchi F., Poggi A., Alpi A., Perata P. A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2005;44:633-645.
- Gursansky N.R., Jouannet V., Grünwald K., Sanchez P., Laaber-Schwarz M., Greb T. MOL1 is required for cambium homeostasis in Arabidopsis. *Plant J*. 2016;17. DOI 10.1111/tpj.13169.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 2004;131(3):657-668.
- Heidstra R., Sabatini S. Plant and animal stem cells: similar et different. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014;15(5):301-312. DOI 10.1038/nrm3790.
- Hinsch J., Vrabka J., Oeser B., Novák O., Galuszka P., Tudzynski P. *De novo* biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environ. Microbiol*. 2015;17(8):2935-2951. DOI 10.1111/1462-2920.12838.
- Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2010;22:2618-2629. DOI 10.1105/tpc.110.076083.

- Hirakawa Y., Shinohara H., Kondo Y., Inoue A., Nakanomyo I., Oga-
wa M., Sakagami Y. Non-cell-autonomous control of vascular stem
cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl Acad. Sci.
USA*. 2008;105:15208-15213. DOI 10.1073/pnas.0808444105.
- Hobe M., Muller R., Grunewald M., Brand U., Simon R. Loss of
CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restrict-
ing signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. *Dev. Genes
Evol.* 2003;213:371-381.
- Huang G.Z., Dong R.H., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S.
A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant
transcription factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006;19:463-470.
- Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plantcallus: mechanisms of in-
duction and repression. *Plant Cell*. 2013;25(9):3159-3173. DOI
10.1105/tpc.113.116053.
- Ilegems M., Douet V., Meylan-Bettex M., Uyttewaal M., Brand L.,
Bowman J.L., Stieger P.A. Interplay of auxin, KANADI and
Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation.
Development. 2010;137(6):975-984. DOI 10.1242/dev.047662.
- Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium* rhi-
zogenes genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylo-
gen. Evol.* 2001;20:100-110.
- Itô Y., Nakanomyo I., Motose H., Iwamoto K., Sawa S., Dohmae N.,
Fukuda H. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell
differentiation. *Science*. 2006;313:842-845.
- Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A.,
Hedden P., Tsiantis M. KNOX action in Arabidopsis is mediated by
coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr.
Biol.* 2005;15:1560-1565.
- Ji J., Shimizu R., Sinha N., Scanlon M.J. Analyses of WOX4 transgen-
ics provide further evidence for the evolution of the WOX gene fam-
ily during the regulation of diverse stem cell functions. *Plant Signal
Behav.* 2010b;5(7):916-920. DOI 10.1104/pp.109.149641.
- Ji J., Strable J., Shimizu R., Koenig D., Sinha N., Scanlon M.J. WOX4
promotes procambial development. *Plant Physiol.* 2010a;152(3):
1346-1356. DOI 10.1104/pp.109.149641.
- Jiang F., Feng Z., Liu H., Zhu J. Involvement of plant stem cells or stem
cell-like cells in dedifferentiation. *Front. Plant Sci.* 2015;6:1028.
DOI 10.3389/fpls.2015.01028.
- Klimaszewska K., Overton C., Stewart D., Rutledge R.G. Initiation
of somatic embryos and regeneration of plants from primordial
shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression pro-
files of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta*.
2011;233:635-647. DOI 10.1007/s00425-010-1325-4.
- Kondo T., Sawa S., Kinoshita A., Mizuno S., Kakimoto T., Fukuda H.,
Sakagami Y. A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ
MALDI-TOF MS analysis. *Science*. 2006;313:845-848.
- Kosan C., Godmann M. Genetic and epigenetic mechanisms that main-
tain hematopoietic stem cell function. *Stem Cells Int.* 2016;2016:
5178965. DOI 10.1155/2016/5178965.
- Kosugi S., Ohashi Y. Constitutive E2F expression in tobacco plants ex-
hibits altered cell cycle control and morphological change in a cell
type-specific manner. *Plant Physiol.* 2003;132(4):2012-2022.
- Krupková E., Schmölling T. Developmental consequences of the tu-
morous shoot development1 mutation, a novel allele of the cellu-
lose-synthesizing KORRIGAN1 gene. *Plant Mol. Biol.* 2009;71(6):
641-655. DOI 10.1007/s11103-009-9546-2.
- Kurdyukov S., Song Y., Sheahan M.B., Rose R.J. Transcriptional regu-
lation of early embryo development in the model legume *Medicago
truncatula*. *Plant Cell Rep.* 2014;33:349-362. DOI 10.1007/s00299-
013-1535-x.
- Lebedeva (Osipova) M.A., Tvorogova V.E., Vinogradova A.P., Ganche-
va M.S., Azarakhsh M., Ilina E.L., Demchenko K.N., Dodueva I.E.,
Lutova L.A. Initiation of spontaneous tumors in radish (*Raphanus
sativus*): cellular, molecular and physiological events. *J. Plant Physiol.*
2015;173:97-104. DOI 10.1016/j.jplph.2014.07.030.
- Lee J.H., Kim D.M., Lim Y.P., Pai H.S. The shooty callus induced by
suppression of tobacco CHRK1 receptor-like kinase is a phenocopy
of the tobacco genetic tumor. *Plant Cell Rep.* 2004;23(6):397-403.
- Leibfried A., To J.P., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M.,
Kieber J.J., Lohmann J.U. WUSCHEL controls meristem function
by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*.
2005;438:1172-1175.
- Lenhard M., Laux T. Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot
meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and
its sequestration by CLAVATA1. *Development*. 2003;130:3163-
3173.
- Lin H., Niu L., McHale N.A., Ohme-Takagi M., Mysore K.S., Tadege
M. Evolutionarily conserved repressive activity of WOX proteins
mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in
plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013;110(1):366-371.
- Liu J., Sheng L., Xu Y., Li J., Yang Z., Huang H., Xu L. WOX11 and 12
are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root
organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2014;26:1081-1093. DOI
10.1105/tpc.114.122887.
- Long J.A., Moan E.I., Medford J.J., Barton M.K. A member of the
KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the SHOOT-
MERISTEMLESS gene of Arabidopsis. *Nature*. 1996;379:66-69.
- Lotan T., Ohto M., Yee K.M., West M.A.L., Lo R., Kwong R.W., Ya-
magishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. Arabidopsis
LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo develop-
ment in vegetative cells. *Cell*. 1998;93:1195-1205.
- Lu S.W., Chen S., Wang J., Yu H., Chronis D., Mitchum M.G., Wang X.
Structural and functional diversity of CLAVATA3/ESR (CLE)-like
genes from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*.
Mol. Plant Microbe Interact. 2009;22(9):1128-1142. DOI 10.1094/
MPMI-22-9-1128.
- Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N.,
Helariutta Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vas-
cular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Gen. Dev.* 2000;14(23):
2938-2943.
- Mähönen A.P., Higuchi M., Törmäkangas K., Miyawaki K., Pische-
ke M.S., Sussman M.R., Helariutta Y., Kakimoto T. Cytokinins
regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis. *Curr.
Biol.* 2006;16:1116-1122.
- Mathesius U., Weinman J.J., Rolfe B.J., Djordjevic M.A. Rhizobia can
induce nodules in white clover by "hijacking" mature cortical cells
activated during lateral root development. *Mol. Plant Microbe Inter-
act.* 2000;13:170-182.
- Matveeva T.V., Frolova N.V., Smets R., Dodueva I.E., Buzovkina I.S.,
Van Onckelen H., Lutova L.A. Hormonal control of tumor formation
in radish. *J. Plant Growth Regul.* 2004;23:37-43.
- Mayer K.F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G., Laux T.
Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis
shoot meristem. *Cell*. 1998;95(6):805-815.
- Mohrin M., Bourke E., Alexander D., Warr M.R., Barry-Holson K., Le
Beau M.M., Morrison C.G., Passequé E. Hematopoietic stem cell
quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell
Stem Cell*. 2010;7(2):174-185. DOI 10.1016/j.stem.2010.06.014.
- Mortier V., Den Herder G., Whitford R., Van de Velde W., Rombauts S.,
D'Haeseleer K., Holsters M., Goormachtig S. CLE peptides control
Medicago truncatula nodulation locally and systemically. *Plant
Physiol.* 2010;153:222-237. DOI 10.1104/pp.110.153718.
- Nardmann J., Reisewitz P., Werr W. Discrete shoot and root stem cell-
promoting WUS/WOX5 functions are an evolutionary innovation of
angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* 2009;26:1745-1755. DOI 10.1093/
molbev/msp084.
- Nardmann J., Werr W. Symplesiomorphies in the WUSCHEL clade
suggest that the last common ancestor of seed plants contained at
least four independent stem cell niches. *New Phytologist*. 2013;199:
1081-1092. DOI 10.1111/nph.12343.
- Ohmori Y., Tanaka W., Kojima M., Sakakibara H., Hirano H.Y. WUS-
CHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 is involved in meristem mainte-
nance and is negatively regulated by the CLE gene FCP1 in rice.
Plant Cell. 2013;25(1):229-241.
- Oka-Kira E., Kawaguchi M. Long-distance signaling to control root
nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006;9:496-502.

- Okamoto S., Ohnishi E., Sato S., Takahashi H., Nakazono M., Tabata S., Kawaguchi M. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 2009;50(1):67-77. DOI 10.1093/pcp/pcn194.
- Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007;19(1):118-130.
- Okushima Y., Mitina I., Quach H.L., Theologis A. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J.* 2005;43:29-46.
- Op den Camp R.H., De Mita S., Lillo A., Cao Q., Limpens E., Bisseling T., Geurts R. A phylogenetic strategy based on a legume-specific whole genome duplication yields symbiotic cytokinin type-A response regulators. *Plant Physiol.* 2011;157(4):2013-2022. DOI 10.1104/pp.111.187526.
- Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol.* 2012;158:1329-1341. DOI 10.1104/pp.111.188078.
- Palovaara J., Hallberg H., Stasolla C., Luit B., Hakman I. Expression of a gymnosperm PIN homologous gene correlates with auxin immunolocalization pattern at cotyledon formation and in demarcation of the procambium during *Picea abies* somatic embryo development and in seedling tissues. *Tree Physiol.* 2010;30:479-489. DOI 10.1093/treephys/tpp126.
- Parizot B., Laplaze L., Ricaud L., Boucheron-Dubuisson E., Bayle V., Bonke M., De Smet I., Poethig S.R., Helariutta Y., Haseloff J., Chriqui D., Beeckman T., Nussaume L. Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiol.* 2008;146:140-148.
- Parizot B., Roberts I., Raes J., Beeckman T., De Smet I. *In silico* analyses of pericycle cell populations reinforce their relation with associated vasculature in *Arabidopsis*. *Philos. Trans. Royal Soc. B. Biol. Sci.* 2012;367:1479-1488. DOI 10.1098/rstb.2011.0227.
- Pautot V., Dockx J., Hamant O., Kronenberger J., Grandjean O., Jublot D., Traas J. KNAT2: evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *Plant Cell.* 2001;13(8):1719-1734.
- Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 2011;65(4):622-633. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x.
- Reineke G., Heinze B., Schirawski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C.W. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilagomaydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol. Plant Pathol.* 2008;9:339-355.
- Replogle A., Wang J., Bleckmann A., Hussey R.S., Baum T.J., Sawa S., Davis E.L., Wang X., Simon R., Mitchum M.G. Nematode CLE signaling in *Arabidopsis* requires CLAVATA2 and CORYNE. *Plant J.* 2011;65:430-440. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04433.x.
- Santiago J., Henzler C., Hothorn M. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science.* 2013;341:889-892. DOI 10.1126/science.1242468.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature.* 2007;446(7137):811-814.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C., Weisbeek P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development.* 1994;120:2475-2487.
- Schnabel E., Journet E.P., de Carvalho-Niebel F., Duc G., Frugoli J. The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* 2005;58(6):809-822.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4:7-25.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F., Jürgens G., Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell.* 2000;100:635-644.
- Schrader J., Nilsson J., Mellerowicz E., Berglund A., Nilsson P., Hertzberg M., Sandberg G. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell.* 2004;16:2278-2292.
- Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S., Buzas D.M., Iturbe-Ormaetxe I., Carroll B.J., Gresshoff P.M. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science.* 2003;299:109-112.
- Sieberer T., Hauser M.T., Seifert G.J., Luschnig C. PROPORZI, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Curr. Biol.* 2003;13:837-842.
- Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957;11:118-130.
- Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr. Biol.* 2009;19:909-914. DOI 10.1016/j.cub.2009.03.060.
- Su Y.H., Liu Y.B., Bai B., Zhang X.S. Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* 2015;14(5):792.
- Su Y.H., Zhao X.Y., Liu Y.B., Zhang C.L., O'Neill S.D., Zhang X.S. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2009;59(3):448-460. DOI 10.1111/j.1365-313X.2009.03880.x.
- Suer S., Agusti J., Sanchez P., Schwarz M., Greb T. WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2011;23:3247-3259. DOI 10.1105/tpc.111.087874.
- Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell.* 2010;18(3):463-471. DOI 10.1016/j.devcel.2010.02.004.
- Suzaki T., Yano K., Ito M., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development.* 2012;139(21):3997-4006. DOI 10.1242/dev.084079.
- Testone G., Bruno L., Condello E., Chiappetta A., Bruno A., Mele G., Tartarini A., Spanò L., Innocenti A.M., Mariotti D., Bitonti M.B., Giannino D. Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] KNOPE1, a class I KNOX orthologue to *Arabidopsis* BREVIPEDICELLUS/KNAT1, is misexpressed during hyperplasia of leaf curl disease. *J. Exp. Bot.* 2008;59:389-402.
- Timmers A., Auriac M.-C., Truchet G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development.* 1999;126(16):3617-3628.
- Tooker J.F., Helms A.M. Phytohormone dynamics associated with gall insects, and their potential role in the evolution of the gall-inducing habit. *J. Chem. Ecol.* 2014;40(7):742-753. DOI 10.1007/s10886-014-0457-6.
- Trotochaud A.E., Hao T., Wu G., Yang Z., Clark S.E. The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell.* 1999;11:393-406.
- Trumpp A., Essers M., Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10(3):201-209. DOI 10.1038/nri2726.
- Ueda M., Zhang Z., Laux T. Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes WOX8/9 links zygote polarity to embryo development. *Dev. Cell.* 2011;15:264-270. DOI 10.1016/j.devcel.2011.01.009.

- Ullrich C.I., Aloni R. Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J. Exp. Bot.* 2000;51(353):1951-1960.
- Van der Graaff E., Laux T., Rensing S.A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Gen. Biol.* 2009;10(12):248. DOI 10.1186/gb-2009-10-12-248.
- Vandeputte O., Oden S., Mol A., Vereecke D., Goethals K., El Jaziri M., Prinsen E. Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:1169-1177.
- Vanstraelen M., Baloban M., Da Ines O., Cultrone A., Lammens T., Boudolf V., Brown S.C., De Veylder L., Mergaert P., Kondorosi E. APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(28):11806-11811. DOI 10.1073/pnas.0901193106.
- Veselov D., Langhans M., Hartung W., Aloni R., Feussner I., Götz C., Veselova S., Schlomski S., Dickler C., Bächmann K., Ullrich C.I. Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta.* 2003;216(3):512-522.
- Wang J., Replogle A., Hussey R., Baum T., Wang X., Davis E.L., Mitchum M.G. Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Mol. Plant Pathol.* 2011;12(2):177-186.
- Wang X., Mitchum M.G., Gao B., Li C., Diab H., Baum T.J., Hussey R.S., Davis E.L. A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to *CLAVATA3/ESR (CLE)* of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* 2005;6:187-191.
- Whitford R., Fernandez A., De Groot R., Ortega E., Hilson P. Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;105:18625-18630.
- Wilson A., Laurenti E., Oser G., van der Wath R.C., Blanco-Bose W., Jaworski M., Offner S., Dunant C.F., Eshkind L., Bockamp E., Lió P., Macdonald H.R., Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008;135(6):1118-1129.
- Yadav R.K., Perales M., Gruel J., Girke T., Jönsson H., Reddy G.V. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Gen. Dev.* 2011;25:2025-2030. DOI 10.1101/gad.17258511.
- Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A., Ori N. Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr. Biol.* 2005;15:1566-1571.
- Zhang F., Wang Y., Li G., Tang Y., Kramer E.M., Tadege M. STENOFO-LIA recruits TOPLESS to repress ASYMMETRIC LEAVES2 at the leaf margin and promote leaf blade outgrowth in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 2014;26(2):650-664. DOI 10.1105/tpc.113.121947.
- Zheng Q., Zheng Y., Perry S.E. AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in Arabidopsis and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiol.* 2013;161:2113-2127. DOI 10.1104/pp.113.216275.
- Zhou Y., Liu X., Engstrom E.M., Nimchuk Z.L., Pruneda-Paz J.L., Tarr P.T., Yan A., Kay S.A., Meyerowitz E.M. Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature.* 2015;517(7534):377-380. DOI 10.1038/nature13853.
- Zimmerman J.L. Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell.* 1993;5(10):1411-1423.

Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише стволовых клеток корня

Е.А. Ощепкова^{1,2}✉, Н.А. Омелянчук^{1,2}, М.С. Савина^{1,2}, Т. Пастернак³, Н.А. Колчанов^{1,2}, Е.В. Землянская^{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 «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Институт биологии II/ молекулярной физиологии растений, Фрайбург, Германия

Ген *WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)* кодирует транскрипционный фактор, который является одним из основных регуляторов поддержания структуры и функционирования ниши стволовых клеток в кончике корня растений. Белок *WOX5* экспрессируется в клетках покоящегося центра апикальной меристемы корня, предотвращая дифференцировку прилегающих к нему инициалей колумеллы и участвуя наряду с *SCR*, *SHR*, *PLT1*, *PLT2* в контроле дифференцировки других инициалей меристемы корня. Однако детали механизмов функционирования этого белка неясны. *WOX5* относится к семейству *WUSCHEL related homeobox (WOX)*, родоначальник которого, транскрипционный фактор *WUSCHEL (WUS)*, обеспечивает поддержание ниши стволовых клеток в меристеме побега. Считается, что ген *WOX5* дивергировал от общего с *WUS* предка у древних покрытосеменных, в результате чего произошла специализация ниш стволовых клеток побега и корня. Однако вопрос дальнейшей дивергенции структуры и функций *WOX5* в процессе эволюции цветковых растений изучен слабо. В данном обзоре представлен системно-биологический анализ гена *WOX5* с целью выявления особенностей его эволюции и механизмов функционирования. Для этого в работе проведен филогенетический анализ 62 аминокислотных последовательностей *WOX5* из публично доступных баз данных, обобщены литературные данные о домене экспрессии *WOX5* у арабидопсиса и других видов и его функциях в онтогенезе, приведены результаты экспериментов по выявлению первичных и вторичных мишеней этого транскрипционного фактора, а также обсуждены данные о возможных механизмах прямой и не прямой регуляции экспрессии *WOX5*. В частности, был проведен анализ промоторных областей гена *WOX5* у 30 видов растений и были высказаны гипотезы о возможных прямых регуляторах экспрессии *WOX5* на основании наличия соответствующих потенциальных сайтов связывания в консервативных областях промоторов гена *WOX5*.

Ключевые слова: развитие корня растения; апикальная меристема корня; стволовые клетки растений; транскрипционный фактор *WOX5*; систематический обзор.

Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche

Е.А. Oshchepkova^{1,2}✉, N.A. Omelyanchuk^{1,2}, M.S. Savina^{1,2}, T. Pasternak³, N.A. Kolchanov^{1,2}, E.V. Zemlyanskaya^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Biology II/Molecular Plant Physiology, Centre for BioSystems Analysis (ZBSA), BIOS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, Freiburg, Germany

WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) gene encodes the transcription factor, which is one of the key regulators, maintaining structure and functioning of the stem cell niche in plant root tips. Protein *WOX5* is expressed in the quiescent center of the root apical meristem, preventing differentiation of columella initials and altogether with *SCR*, *SHR*, *PLT1* and *PLT2* participating in the control of differentiation of other root meristem initials. However, the details of *WOX5* functioning are unclear. The *WOX5* protein belongs to *WUSCHEL related homeobox (WOX)* family, the founder of which is the transcription factor *WUSCHEL (WUS)* providing maintenance of the stem cell niche in the shoot apical meristem. *WOX5* and *WUS* diverged from a common ancestor at the base of angiosperms, which resulted in a specialization of shoot and root stem cell niches. However, the problem of *WOX5* structural and functional divergence during angiosperm evolution was poorly addressed. In this review we present a systems biology analysis of the *WOX5* gene to reveal specific features of its evolution and functioning. To this end, we performed a phylogenetic analysis on 62 publicly available *WOX5* amino acid sequences, generalized published data about *WOX5* expression domain in *Arabidopsis* and other species and its role in development, integrated the results of experiments on identification of primary and secondary targets for this transcription factor. Data on possible mechanisms of direct and indirect regulation of *WOX5* expression were discussed. Particularly, we performed the analysis of *WOX5* promoter regions from 30 species. Possible direct regulators of the *WOX5* gene expression were proposed based on the presence

of putative binding sites for the candidate transcription factors in conserved *WOX5* promoter regions.

Key words: root development; root apical meristem; plant stem cells; *WOX5* transcription factor; systematic review.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ощепкова Е.А., Омелянчук Н.А., Савина М.С., Пастернак Т., Колчанов Н.А., Землянская Е.В. Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише стволовых клеток корня. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Oshchepkova E.A., Omelyanchuk N.A., Savina M.S., Pasternak T., Kolchanov N.A., Zemlyanskaya E.V. Systems biology analysis of the *WOX5* gene and its functions in the root stem cell niche. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):459-474. DOI 10.18699/VJ16.173

Непрерывный рост растения на протяжении всей жизни обусловлен постоянным функционированием стволовых клеток в апикальных меристемах (АМ) побега и корня. Как правило, стволовые клетки АМ (называемые инициалами) претерпевают асимметричное деление, при котором одна из дочерних клеток остается стволовой, а другая дает начало специализированным клеткам того или иного типа (Boyer, Simon, 2015). Баланс внутренних факторов, контролирующих асимметричное деление стволовых клеток, обеспечивает поддержание ниши стволовых клеток (НСК) – упорядоченной анатомической структуры, необходимой для правильного апикального роста (Aichinger et al., 2012). В ее основе – организующий центр (ОЦ), непосредственно контактирующий со стволовыми клетками. Клетки ОЦ (в корне он называется покоящимся центром, ПЦ) характеризуются низкой митотической активностью и играют ключевую роль в поддержании индивидуальных характеристик контактирующих с ним стволовых клеток, подавляя их дифференцировку (van den Berg et al., 1997; Scheres, 2007).

Ключевыми регуляторами поддержания структуры и функционирования НСК апикальных меристем являются транскрипционные факторы (ТФ), например, для НСК корня это *PLETHORA1*, *PLETHORA2* (*PLT1/2*), *SCARECROW* (*SCR*), *SHORT-ROOT* (*SHR*) и другие, а также фитогормоны, такие как ауксин и цитокинин (Sablowski, 2011; Aichinger et al., 2012; Clark et al., 2014). Существенный вклад в этот процесс вносят малые РНК и сигнальные пептиды (CLEP). Все вместе они формируют сложную сеть взаимодействий, способную воспринимать и передавать различные регуляторные сигналы (Bennett et al., 2014).

В поддержании ниши стволовых клеток АМ корня важную роль играет ТФ *WOX5* семейства *WUSCHEL* related homeobox (*WOX*), представители которого специфичны для растений и регулируют различные этапы их развития (van der Graaff et al., 2009). У *Arabidopsis thaliana* L. семейство *WOX* представлено 15 транскрипционными факторами. Родоначальник семейства, белок *WUSCHEL* (*WUS*), участвует в поддержании НСК в АМ побега, контролируя сохранение плюрипотентности стволовых клеток (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998), регулирует их количество и паттерн клеточных делений, а также первые этапы дифференцировки их клеток-потомков (Yadav et al., 2010). Остальные представители семейства (в том числе и *WOX5*) были выявлены на основании сходства первичной структуры кодирующих их генов с последо-

вательностью гена *WUS*, благодаря наличию консервативного гомеодомена с характерной структурой (Mayer et al., 1998; Haecker et al., 2004). У белков *WUS* и *WOX1–7* имеется также дополнительный консервативный мотив (так называемый *WUS*-бокс) длиной в восемь аминокислотных остатков (консенсус *TLPLFPMH*) (Haecker et al., 2004; Gao et al., 2014). Характерной чертой ортологов *WOX5*, позволяющей отличать их от других представителей семейства *WOX*, является наличие трипептида *ESK* (глутаминовая кислота, серин, лизин) в гомеодомене на N-конце ДНК-распознающей спирали, который у остальных белков семейства представлен с заменой серина на глицин, т.е. трипептидом *EGK* (Nardmann, Wert, 2012) (Доп. материалы 1¹). Считается, что гены *WUS* и *WOX5* имеют монофилетическое происхождение, и их функциональное разделение началось у древних покрытосеменных (Nardmann et al., 2009). Однако о дальнейшей эволюции *WOX5* у цветковых растений известно немного.

У *A. thaliana* ген *WOX5* экспрессируется в клетках покоящегося центра АМ корня (Haecker et al., 2004) (Доп. материалы 2). Специфическая экспрессия *WOX5* во многом определяет организующие свойства ПЦ. В частности, было показано, что мутации, приводящие к потере функции *WOX5* у *A. thaliana*, вызывают терминальную дифференцировку стволовых клеток колумеллы (Sarkar et al., 2007). Сверхэкспрессия *WOX5*, напротив, блокирует нормальную дифференцировку потомков стволовых клеток, что приводит к появлению нового пула клеток, подобных стволовым. Важную роль в этой регуляции играет межклеточная мобильность белка *WOX5*, который мигрирует из клеток ПЦ в прилегающие к нему стволовые клетки (Pi et al., 2015).

Цель нашей работы – выявление особенностей эволюции гена *WOX5* и механизмов его функционирования на основании анализа данных, опубликованных в статьях или представленных в информационных ресурсах по нуклеотидным и белковым последовательностям. Описание паттерна и регуляции экспрессии гена *WOX5*, его происхождения, а также возможных механизмов его функционирования получено с помощью интеграции информации из всех англоязычных публикаций базы данных PubMed, касающихся гена *WOX5* и его белкового продукта. Для филогенетического анализа аминокислотных последовательностей ортологов *WOX5* были выбраны все последовательности из баз данных Protein database (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20-4/appx2.pdf>

nih.gov/protein/) и UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), аннотированные как *WOX5* или *WOX5-like* и содержащие специфический для *WOX5* трипептид ESK в гомеодомене (см. Доп. материалы 1). Исключение было сделано для последовательностей из *Picea abies* и *Pinus pinaster*, содержащих в гомеодомене трипептид EGK, исходя из предположения о дупликации проортолога *WUS/WOX5* у голосеменных (Hedman et al., 2013). Последовательность гипотетического белка *WOX5-1* плауна (*Selaginella moellendorffii*) выступала в качестве внешней группы. Для анализа промоторных областей ортологов *WOX5* были использованы все доступные в базе данных GeneBank нуклеотидные последовательности 5'-регуляторных областей генов *WOX5*. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью доступных биоинформатических инструментов.

Филогения *WOX5*

В филогенетическом дереве белков семейства *WOX* можно выделить три основные клады: современную (*WUS*), промежуточную (*WOX9/11*) и древнюю (*WOX10/13*) (van der Graaff et al., 2009). Считается, что современная клада специфична для семенных растений, промежуточная содержит последовательности, дивергировавшие у предков сосудистых растений, а древняя включает последовательности с высокой гомологией с генами из зеленых водорослей и мха (Nardmann et al., 2009; Lian et al., 2014). Последовательности *WUS* и *WOX5* относят к современной кладе, их ортологи обнаруживаются у цветковых растений и представителей голосеменных (Hedman et al., 2013), однако гипотетические предковые формы *WUS* выявляются также у некоторых папоротников (Nardmann, Weig, 2012). Тем не менее происхождение и пространственное разделение функций *WUS* и *WOX5* в процессе эволюции нуждаются в дальнейшем исследовании.

Ранее предполагалось, что гены *WUS* и *WOX5* существовали у голосеменных в виде единого предшественника, а в дальнейшем у покрытосеменных произошли его дупликация и разделение белков *WUS* и *WOX5* по функциям (Nardmann et al., 2009). Однако недавно гомологи обоих генов были обнаружены у представителя голосеменных *Picea abies* (Hedman et al., 2013), что свидетельствует о более раннем, чем предполагалось, происхождении гена *WOX5*. Возможно, функциональная дивергенция генов *WUS* и *WOX5* свойственна именно покрытосеменным, поскольку у *P. abies* *WOX5* экспрессируется в кончиках как корней, так и побегов.

В геномах некоторых полиплоидных видов ген *WOX5* представлен несколькими паралогами. Так, в геноме гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* присутствуют три гомологичные копии *WOX5* – *TaWOX5a*, *TaWOX5b* и *TaWOX5c* – с длинами 639, 630 и 633 н. п. соответственно (Zhao et al., 2014). Паттерны экспрессии паралогов, а также аминокислотные последовательности их продуктов практически идентичны, что, вероятно, свидетельствует о функциональной эквивалентности этих белков. В геноме кукурузы (*Zea mays*), древнего сегментного аллотетраплоида (Gaut, Doebley, 1997), два паралога – *ZmWOX5A* и *ZmWOX5B* – напротив, демонстрируют альтернативные паттерны экспрессии (Nardmann et al.,

2007). Так, *ZmWOX5B* экспрессируется в ПЦ и ближайших к нему инициалах клеток сосудистой системы, тогда как *ZmWOX5A* экспрессируется в раннем эндосперме и в зародышевом корешке в 4–6-м слоях под ПЦ после инициации в зародыше примордия первого листа. Исходя из особенностей экспрессии, можно предположить, что *ZmWOX5B* является более близким паралогом канонических *WOX5* других видов, а *ZmWOX5A* приобрел некую новую функцию. Образование *Z. mays* как аллотетраплоида произошло более 11 млн лет назад (Haider, 2013), и этого периода времени оказалось достаточно для того, чтобы паралоги *ZmWOX5A* и *ZmWOX5B* дивергировали в функциональном плане.

Дивергенция последовательностей *WOX5* происходила, судя по всему, на ранних этапах эволюции цветковых растений. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ортологов *WOX5* из восьми разных видов (арабидопсис, пшеница, кукуруза, рис, соя, виноград, горошек и нимфея) позволил сделать вывод о том, что гены *WOX5* однодольных и двудольных растений существенно отличаются: большой район нуклеотидной последовательности между гомеодоменом и *WUS*-боксом, свойственный однодольным, у двудольных отсутствует (Zhao et al., 2014). Это позволило высказать предположение, что гены *WOX5* дивергировали вместе с разделением покрытосеменных растений на однодольные и двудольные. Возможно, что данная дивергенция имеет отношение к разнице в строении корневой системы у этих таксономических классов и связанным с этим различиям в функционировании *WOX5*.

Мы подтвердили дивергенцию *WOX5* у однодольных и двудольных, выявленную ранее (Zhao et al., 2014) на более расширенном списке 62 аминокислотных последовательностей белка *WOX5* 58 видов растений (рис. 1; Доп. материалы 3). Наряду с этим мы выявили значимые различия между аминокислотными последовательностями белка *WOX5* у голосеменных и покрытосеменных растений. Таким разделением на голосеменные и покрытосеменные и последних на однодольные и двудольные филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей белков *WOX5* в целом отражает эволюцию таксонов растений. Исключением является расположение *WOX5* некоторых видов, не соответствующее эволюционному порядку их таксонов, что может свидетельствовать о специфичной структуре меристемы их корня.

Базальные покрытосеменные амборелла волосистоножковая (*Amborella trichopoda*) и кувшинка (*Nymphaea jamesoniana*) на дереве расположились выше разделения однодольных и двудольных, при этом не образуя единой клады. Такое строение филогенетического дерева повторяет результаты ранее проведенных таксономических исследований группы базальных покрытосеменных, основанных на анализе нескольких генов из ядерных, пластидных и митохондриальных геномов (Qiu et al., 2005).

Аир болотный (*Acorus calamus*) принадлежит к базальным однодольным (Duvall, 1993). На эволюционном дереве *WOX5*, построенном нами, этот вид локализуется чуть выше базальных покрытосеменных, до разделения однодольных и двудольных, что соответствует его эволюционной истории. Как и базальные покрытосеменные, аир

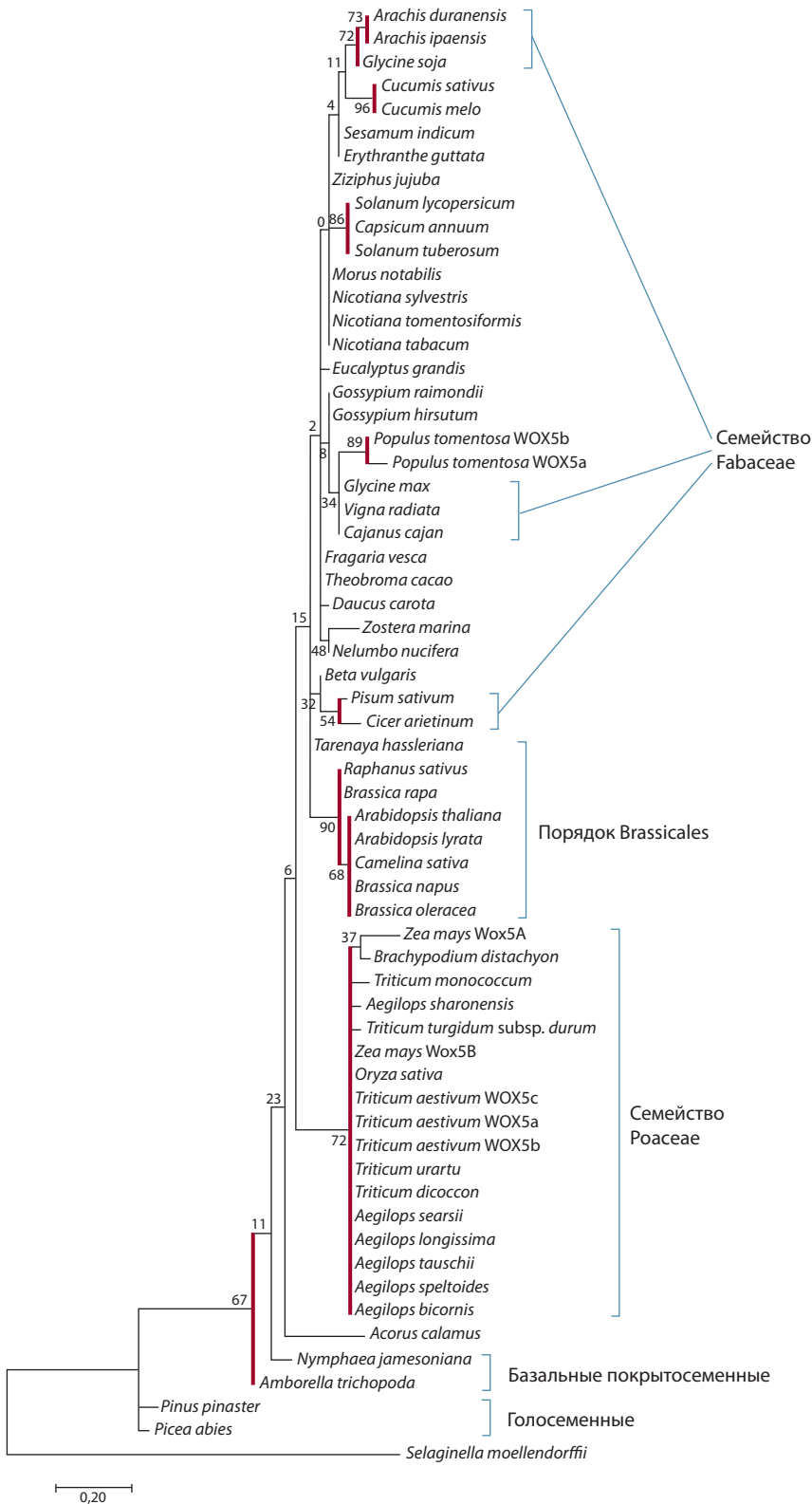


Рис. 1. Филогенетическое дерево белков *WOX5*.

Дерево построено с помощью метода максимального правдоподобия в программе MEGA7 (бутстрэп-поддержка 1000 итераций), выборка выровнена по методу ClustalW (Kumar et al., 2016). Длина каждой ветви соответствует количеству замен в исследуемой последовательности. Всего было проанализировано 62 последовательности аминокислот 58 видов растений (Доп. материалы 3). Позиции, в которых был пропуск аминокислот при выравнивании, при построении дерева не учитывались. Выделены клады с бутстрэпом выше либо равным 50. Последовательность гипотетического белка *WOX5-1* плауна (*Selaginella moellendorffii*) использовали в качестве внешней группы.

все еще совмещает в своей морфологии и анатомии признаки обоих классов. В апикальной меристеме корня аира слой эпидермиса образуется из периферических клеток кортекса, что характерно для однодольных, в то время как образование придаточной корневой у этого вида сходно с таковым у базальных покрытосеменных. Из этого следует, что по строению корня аир и кувшинка ближе друг к другу, чем к другим однодольным и двудольным соответственно (Soukup et al., 2005). Известно, что *WOX5* является одним из ключевых факторов, определяющих развитие строения корня, и это может объяснять полученное нами расположение *AcWOX5* на филогенетическом дереве.

Белки *WOX5* однодольных, представленных видами из семейства злаковых, объединились в одну кладу. Как упоминалось выше, в геноме кукурузы (*Z. mays*) есть два паралога *WOX5*: *WOX5A* и *WOX5B* (Nardmann et al., 2007). В кладе семейства злаковых аминокислотных замен больше всего накоплено в белке *WOX5A* кукурузы. По характеру экспрессии и функциям *WOX5B* ближе к *WOX5* других видов, чем к *WOX5A*, что и отражает результат построения филогенетического дерева. *WOX5* еще одного однодольного растения, взморника морского (*Zostera marina*), неожиданно расположился в кладе двудольных. Следует отметить, что взморник растет в морской воде (Olsen et al., 2016), и возможно, адаптация к таким специфическим условиям обитания привела к возникновению отличий в структуре корня и функциях *WOX5* этого растения. Отметим, что *WOX5* взморника морского на дереве находится близко с последовательностью *WOX5* лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera*), который тоже является водным (но в этом случае пресноводным) растением. Известно, что водные покрытосеменные лишены корневого чехлика (Поплавская, 1971; Kita, Kato, 2005). Эта специфика в развитии корня может быть связана с особенностями функционирования *WOX5* и отражаться на его структуре.

В большой кладе двудольных выделяется субклада семейства крестоцветных, объединившая *Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata*, *Brassica napus*,

B. oleracea, *B. rapa*, *Camelina sativa*, *Raphanus sativus*. Рядом с белками семейства крестоцветных находится *Tarenaya hassleriana* из семейства клеомовых, которое принадлежит порядку Brassicales, включающему также семейство крестоцветных (Brassicaceae), что и объясняет близость ThWOX5 и WOX5 крестоцветных на филогенетическом дереве.

Можно заметить, что бобовые не образовали единой клады на дереве, а расположились в разных его частях. При этом белки WOX5 из двух геномов сои, дикорастущей (*Glycine soja*) и окультуренной (*Glycine max*), оказались в разных кладах. Возможная причина такого строения в том, что геномы данных растений имеют значительные отличия, вызванные селекцией в процессе domestikации окультуренной сои, – сравнение их геномов выявило 425 уникальных генов (из них 12 кодируют ТФ), которые присутствуют в возделываемой сое, но отсутствуют в дикорастущей (Joshi et al., 2013).

Филогения белка WOX5 в основном повторяет филогению таксонов растений, исключение могут составлять виды со специальной морфологией корня, адаптированной к определенным условиям среды (например, водные растения).

Паттерн экспрессии WOX5 у арабидопсиса и его функции в онтогенезе

Во взрослых растениях *A. thaliana* WOX5 экспрессируется в ПЦ апикальной меристемы корня, откуда продукт этого гена мигрирует в инициали колумеллы (Haescker et al., 2004; Pi et al., 2015). В зародышах экспрессия WOX5 инициируется при преддетерминации ПЦ, т.е. в предшественниках клеток ПЦ. Начинается экспрессия WOX5 в одноклеточной гипофизе на 32-клеточной глобулярной стадии зародыша (см. Доп. материалы 4). После горизонтального деления клетки гипофизы WOX5 экспрессия продолжается в более близком предшественнике ПЦ, верхней линзообразной клетке гипофизы, и исчезает в ее дочерней клетке, предшественнице клеток колумеллы (Scheres et al., 1994; Haescker et al., 2004). ПЦ полностью формируется на сердечковидной стадии зародыша в результате двух циклов делений верхней линзообразной клетки, и WOX5 экспрессируется во всех его четырех клетках.

Экспрессия WOX5, в первую очередь, необходима для поддержания стволового состояния клеток инициалей колумеллы и ПЦ, так как в ее отсутствие в проростках нулевых мутантов *wox5* все ткани зародышевого корня функционируют нормально, за исключением ПЦ и колумеллы, клетки которых при созревании зародыша и далее при его прорастании дифференцируются и могут значительно увеличиваться в размерах (Sarkar et al., 2007; Forzani et al., 2014). Кроме того, у зрелых зародышей *wox5* мутантов часто имеются три слоя колумеллы вместо четырех в норме (80 % зародышей), у некоторых клеток колумеллы не происходит цитокинез, они занимают два слоя (92 % зародышей), значительно увеличено число клеточных делений в ПЦ (1,4 деления на корень у мутанта и 0,013 в норме) (Forzani et al., 2014). У *wox5* мутанта увеличение числа делений в ПЦ регистрировалось также и в корне проростка. Следовательно, WOX5 контролирует число клеток в колумелле (на стадии ее формирования

в зародыше), число делений в ПЦ и поддержание пула стволовых клеток колумеллы (или дистальных стволовых клеток) в меристеме корня.

В одиночных *wox5* мутантах проксимальные стволовые клетки, т.е. инициали сосудистых клеток, перицикла, эндодермиса/кортекса и эпидермиса/бокового корневого чехлика, развиваются так же, как в диком типе (Sarkar et al., 2007). Однако добавление мутации *wox5* к одиночным мутантам *scr-4* и *shr-1* или к двойному *plt1 plt2* приводит к дифференцировке проксимальных стволовых клеток, что позволяет предполагать, что гены WOX5, SCR, SHR, PLT1 и PLT2 совместно и взаимозаменяемо контролируют поддержание пула проксимальных стволовых клеток.

WOX5 экспрессируется также с первых стадий закладки примордиев боковых и придаточных корней, маркируя предшественников клеток ПЦ в этих корнях (Ditengou et al., 2008; Della Rovere et al., 2013). Тем не менее боковые и придаточные корни образуются в *wox5* мутантах, но с меньшей интенсивностью, чем в диком типе (Gonzali et al., 2005; Tian et al., 2014a). У *wox5* мутантов в боковых корнях так же, как и в первичном корне, происходит преждевременная дифференцировка ПЦ и инициалей колумеллы (Tian et al., 2014a).

Наряду с ПЦ WOX5 экспрессируется в зародыше в примордиях семядолей, где начиная с сердечковидной стадии он выявляется в группах клеток, расположенных в точках формирования в сосудистой системе семядолей латеральных жилок (Haescker et al., 2004). Экспрессия достигает максимума на поздней сердечковидной стадии зародыша, все еще хорошо регистрируется на торпедообразной стадии и затем снижается. В пользу того, что WOX5 наряду с формированием меристемы корня участвует также в формировании семядолей и меристемы побега, говорит тот факт, что у четвертных мутантов *wox1 wox2 wox3 wox5* проростки имеют аномалии развития семядолей и меристемы побега у 82 % растений (одна семядоля вместо двух, палочкообразный вырост на месте АМ и семядолей и полное отсутствие побега у 34, 30 и 18 % растений соответственно) (Breuning et al., 2008). При этом в развитии побега, судя по всему, практически равнозначно и взаимозаменяемо участвуют все четыре WOX гена, так как в одиночных мутантах аномалии побега проявляются только в наличии одной семядоли у 7 % (*wox2*) и 2 % (*wox3*) зародышей; в двойных и тройных мутантах увеличение процента зародышей с одной семядолей происходит только в случаях *wox2 wox3* (12 %) и *wox1 wox2 wox3* (31 %).

WOX5 экспрессируется также в зрелой пыльце и в пыльцевых трубках при ее прорастании (Dorantes-Acosta, Vielle-Calzada, 2006). Экспрессия WOX5 в данном случае необходима для нормального прорастания пыльцы.

Во время инициации и образования каллуса из различных эксплантов арабидопсиса (корней, листьев, лепестков, семядолей) происходит усиление экспрессии WOX5 наряду с другими генами НСК корня и ауксин-активируемыми генами (Sugimoto et al., 2010). При этом активация этих генов происходит за счет эпигенетического репрограммирования, т.е. путем снятия гиперметилирования гистона H3 по Lys27 (H3K27me3) в их промоторах (He et al., 2012). Эти и другие исследования (Che et al., 2007; Atta

et al., 2009) наглядно демонстрируют, что работа генных сетей инициации боковых корней является необходимой стадией в процессе образования каллуса, что включает активацию экспрессии *WOX5*. Другими словами, активация экспрессии *WOX5* и других генов НСК корня необходима для индукции плюрипотентности и репрограммирования клеток. Как уже упоминалось выше, *WOX5* начинает экспрессироваться с первых делений клетки основателя (founder cell) латерального корня (Ditengou et al., 2008). При обработке цитокинином инициация меристемы побега и самого побега возможна напрямую из примордия бокового корня без промежуточной стадии каллусообразования (Chatfield et al., 2013). Экспрессия *WOX5* наряду с другими генами НСК корня может быть маркером состояния плюрипотентности, так как при переносе клеток на среды со специальным составом гормонов можно осуществить регенерацию как побегов, так и корней.

Паттерн экспрессии *WOX5* у других видов растений

Как и у арабидопсиса, экспрессия *WOX5* в ПЦ отмечалась у гороха (*Pisum sativum*) (Osipova et al., 2012), люцерны (*Medicago truncatula*) (Imin et al., 2007; Chen et al., 2009), риса (*Oryza sativa*) (Kamiya et al., 2003) и кукурузы (*Z. mays*) (Nardmann et al., 2007). У люцерны, риса, кукурузы экспрессия *WOX5* была также описана в клетках-предшественниках ПЦ в зародыше (Kamiya et al., 2003; Imin et al., 2007; Nardmann et al., 2007; Chen et al., 2009).

У растений из семейства бобовых, *M. truncatula* и *P. sativum*, *WOX5* также экспрессируется при развитии симбиотических азотфиксирующих клубеньков, участвуя, как и при каллусообразовании, в репрограммировании клеточной дифференцировки (Osipova et al., 2012). На 3–4-й день после индукции образования клубенька *WOX5* транскрипт виден в сайте инициации клубенька (в некоторых клетках перидермы, эндодермиса и кортекса, расположенных напротив ксилемных полюсов). Также небольшой сигнал отмечается во внешних клетках кортекса. На 5–6-й день экспрессия распространяется по всему примордию клубенька. Затем экспрессия *WOX5* постепенно падает и на 12–14-й день регистрируется только на периферии развивающихся клубеньков. В зрелых клубеньках (21–28 дней после индукции) *WOX5* экспрессируется только в нескольких клетках на конце сосудистого пучка клубенька. Развитие опухолей растений гороха, вызываемых бактерией *Agrobacterium tumefaciens*, также связано с увеличением экспрессии *WOX5* в клетках опухоли (Vinogradova et al., 2015). Таким образом, экспрессия *WOX5* у других видов, как и у арабидопсиса, может быть связана с репрограммированием, т. е. изменением пути дифференцировки клетки.

У кукурузы *ZmWOX5B* экспрессируется не только в ПЦ, но и в инициалах стеги и их потомках, т. е. в базальной части сосудистой системы (Nardmann et al., 2007). В ходе онтогенеза экспрессия *ZmWOX5B* начинается в центре шестидневного зародыша. Далее на стадии развития котиледонов домен экспрессии *ZmWOX5B* становится окруженным со всех сторон доменом экспрессии гена *KNOTTED1*. Причем в областях экспрессии этих генов нет перекрытия. После этого экспрессия *ZmWOX5B*

фокусируется в ПЦ и расположенных над ним предшественниках клеток сосудистой системы. *ZmWOX5A* экспрессируется в раннем эндосперме сразу после того, как его базальный слой становится клеточным. Далее он регистрируется в суспензоре зародыша (в 4–6 слоях под ПЦ корешка) после первой стадии образования листьев (см. Доп. материалы 4). В проростке *ZmWOX5A* экспрессируется в эпидермисе корня, который участвует в поглощении ионов из ризосферы в корень. Можно сделать вывод, что у кукурузы ортолог *AtWOX5*, каким является *ZmWOX5B*, имеет более расширенный домен экспрессии по сравнению с *AtWOX5*, а его паралог, *ZmWOX5A*, имеет свой собственный специфический домен экспрессии. Во всех видах, в которых исследовали экспрессию *WOX5*, она была обнаружена в ПЦ (хотя бы у одного из паралога *WOX5*), тем не менее у отдельных видов экспрессия может иметь специфические особенности.

Сигнальные пути, регулирующие экспрессию *WOX5*

В регуляции активности гена *WOX5* выявлено участие сигнальных путей ауксина, цитокинина и сахаров. Сахара в растительном мире также играют роль сигнальных молекул и, как ауксин и цитокинин, контролируют значительное число процессов роста и развития (Lastdrager et al., 2014).

Наиболее сложной является тканеспецифичная и дозозависимая регуляция ауксином экспрессии гена *WOX5* (Gonzali et al., 2005; Ding, Friml, 2010). Распределение ауксина имеет максимум в ПЦ и инициалах колумеллы (Sabatini et al., 1999; Brunoud et al., 2012), в то время как РНК *WOX5* экспрессируется в ПЦ, но не обнаружена в инициалах колумеллы. При ауксиновом ответе происходит деградация белков семейства Aux/IAA (Auxin/Indole Acetic Acid), супрессоров ТФ ауксинового ответа (Auxin Response Factors, ARFs) (Sauer et al., 2013). В ПЦ ауксиновый ответ опосредуется Aux/IAA белком IAA17/AXR3 (Ding, Friml, 2010). Сверхэкспрессия IAA17/AXR3 ослабляет в ПЦ как сигнал ответа на ауксин, так и экспрессию *WOX5*, в то время как в *axr3* мутанте и экспрессия *WOX5*, и сигнал ауксинового ответа выходят за пределы ПЦ и регистрируются также в инициалах кортекса/эндодермиса (Tian et al., 2014b). ARF10 и ARF17 в норме подавляют экспрессию *WOX5* в колумелле, так как при подавлении функции обоих генов *WOX5* начинает там слабо экспрессироваться (при этом экспрессия *WOX5* в ПЦ происходит так же, как в диком типе) (Ding, Friml, 2010). Обработка растения экзогенным ауксином в течение 24 ч подавляет экспрессию *WOX5* в пределах его домена (ПЦ) до слабо детектируемой, но вызывает эктопическую экспрессию в инициалах эндодермиса/кортекса. При воздействии ауксином в течение трех суток экспрессия *WOX5* полностью исчезает. В то же время при подавлении функции ARF10 и ARF17, несмотря на такую же длительность обработки ауксином, в ПЦ сохраняется достаточно выраженная экспрессия *WOX5*. При длительности ответа *WOX5* на ауксин, занимающей сутки и более, можно предположить, что *WOX5*, скорее всего, не является прямой мишенью ауксинового ответа, а регулируется ауксином опосредованно.

С другой стороны, при мутации гена *LAX2*, кодирующего белок, импортирующий ауксин в клетку (Like Auxin Resistant 2), снижаются уровень ауксина в ПЦ и экспрессия гена *WOX5* (Zhang et al., 2013). Одним из возможных объяснений может быть существование определенного интервала концентраций ауксина в ПЦ, превышение или понижение которых ведет к снижению активности *WOX5*.

Такая сложная регуляция ауксином экспрессии *WOX5* может происходить из-за того, что белок *WOX5*, в свою очередь, активирует сигнальный путь ауксина, т. е. существует обратная связь (Tian et al., 2014b). *DR5rev::GFP* сигнал (сенсор ауксинового ответа), в норме имеющий максимум в ПЦ, очень слабо проявляется в ПЦ у *wox5* мутантов, подчеркивая важную роль *WOX5* в поддержании максимума ауксина в ПЦ. При исследовании растений, мутантных по *WOX5* или сверхэкспрессирующих этот ген, не было обнаружено изменений в экспрессии генов как деконъюгации ауксина, так и его полярного транспорта, в то время как уровень свободного ауксина и *DR5::GUS* сигнал были повышены по сравнению с нормой в *35S::WOX5-GR* растениях и уменьшены в *wox5* мутантах. Так как влияния *WOX5* на деконъюгацию ауксина отмечено не было, то было высказано предположение о том, что изменения в уровне ауксина при сверхэкспрессии *WOX5* можно объяснить тем, что *WOX5* влияет на синтез ауксина. В растениях со сверхэкспрессией *WOX5* было обнаружено значительное увеличение экспрессии гена *YUC1*, кодирующего один из двух ферментов основного пути биосинтеза ауксина из триптофана (*YUCCA 1*), в то время как ген *TAA1/WEI8*, кодирующий другой фермент этого пути (Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis 1), не показал отличий от дикого типа. В то же время уровень транскрипции *TAA1/WEI8* уменьшался в два раза при сверхэкспрессии *IAA17/AXR3* и, наоборот, увеличивался в четыре раза в *axr3* мутантах (Tian et al., 2014b). Результаты компьютерного моделирования показали, что наличие регуляторного контура, связывающего положительную регуляцию синтеза ауксина, осуществляемую *WOX5*, с его активацией в ответ на ауксин и ингибированием ответа на ауксин с помощью *IAA17/AXR3*, необходимо и достаточно для поддержания максимума ауксина в кончике корня и ниши дистальных стволовых клеток. При самых первых этапах закладки боковых корней повышенный уровень ауксина в клетке-основателе предeterminирует ПЦ через активацию экспрессии *WOX5* (Ditengou et al., 2008).

В корне цитокинин подавляет экспрессию *WOX5* наряду с экспрессией гена *SCR* (кодирующего ТФ семейства GRAS) и генов-транспортеров *AUX1* (*Auxin Resistant 1*) и *LAX2*, привносящих ауксин в клетку (Zhang et al., 2013). Значительное падение уровня *WOX5* транскрипта наблюдается примерно через 8 ч после обработки. Падение экспрессии *LAX2* наблюдалось гораздо раньше. Следовательно, регуляция экспрессии *WOX5* цитокинином может осуществляться через изменение под влиянием цитокинина потоков ауксина в корне, так как фенотип *lax2* мутанта копирует фенотип растения при обработке цитокинином: в нем снижены экспрессия *WOX5* и ответ на ауксин и увеличено число делений клеток ПЦ. Кроме

того, известно, что *SCR* активирует *WOX5* (Sarkar et al., 2007), и регуляция цитокинином *WOX5* может быть также опосредована через *SCR*.

У зародышей арабидопсиса при потере функции двух ингибиторов сигнального пути цитокинина, *ARR7* или *ARR15*, наблюдались эктопическое усиление цитокининового сигнала в клетках базальной части зародыша и существенное уменьшение экспрессии *WOX5* и других генов НСК корня (Muller, Sheen, 2008). При одиночных мутациях подобных аномалий не наблюдалось, что может говорить о взаимной способности *ARR7* или *ARR15* компенсировать недостаток активности другого гена.

Индукция экспрессии *WOX5* осуществляется также туранозой – природным дисахаридом, неметаболизируемым изомером сахарозы (Gonzali, 2005) и, скорее всего, как и индукция цитокинином, опосредована ауксином.

В регуляции экспрессии *WOX5* играют роль сигнальные пути ауксина, цитокинина и других соединений, но основной компонентой этих сигнальных путей, судя по всему, является регуляторный контур ауксин–*WOX5* с дозозависимым и тканеспецифичным контролем ауксином экспрессии *WOX5* и обратной связью, основанной на активации *WOX5* синтеза ауксина.

Регуляция транскрипции гена *WOX5*

Регуляция экспрессии *WOX5* обеспечивается на эпигенетическом, транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (табл. 1). При этом она может осуществляться как напрямую, при непосредственном контакте регуляторного фактора с промотором, транскриптом или белком *WOX5*, так и через посредников. Однако в большинстве случаев еще не установлено, к какому типу регуляции активности гена *WOX5* (прямого или непрямого) относится воздействие фактора. Для удобства изложения мы разделили эту главу по типам функций факторов, задействованных в регуляции *WOX5*.

Эпигенетические факторы, влияющие на экспрессию *WOX5*

В настоящее время среди всех аспектов регуляции *WOX5* наибольшее число данных имеется относительно регуляции экспрессии *WOX5* эпигенетическими факторами. В ядре эукариот геномная ДНК в комплексе с гистонами образует ДНК-белковый комплекс (хроматин), структура которого в промоторе гена определяет его доступность для ТФ (Clapier, Cairns, 2009). Наряду с метилированием и деметилированием ДНК, модификации гистонов (метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и обратные им процессы) являются событиями эпигенетической регуляции. Основная единица хроматина, нуклеосома, состоит из 146-нуклеотидной ДНК, обернутой вокруг октомера из четырех гистонов (H2A, H2B, H3 и H4), каждый из которых представлен в двух экземплярах. Модификация гистонов достаточно часто осуществляется по лизину (K), например, в гистоне H3 лизины 4, 9, 27 и 36 (H3K4, H3K9, H3K27 и H3K36) могут быть моно- (me), ди- (me₂) и триметилированы (me₃) (Sharma et al., 2015). H3K4 и H3K36 метилированы в промоторах активных генов, в то время как метилирование H3K9 и H3K27 ха-

Таблица 1. Факторы, оказывающие влияние на экспрессию гена *WOX5*

Фактор	Функция по отношению к <i>WOX5</i>	Эксперименты, в которых выявлена функция
Эпигенетические факторы регуляции транскрипции		
ATX1/SDG27	Подавляет (активирует репрессор) экспрессию <i>WOX5</i> в инициалах сосудистой системы	В <i>atx1</i> мутантах <i>WOX5</i> помимо покоящегося центра экспрессируется также в инициалах сосудистой системы (Napsucially-Mendivil et al., 2014)
CLF	Подавляет экспрессию <i>WOX5</i> в покоящемся центре	У <i>clf</i> мутантов увеличена экспрессия <i>WOX5</i> в покоящемся центре (Aichinger et al., 2012)
ELP2	Активирует экспрессию <i>WOX5</i>	В <i>elp2</i> мутанте подавлена экспрессия гена <i>WOX5</i> (Jia et al., 2015)
PKL	Активирует экспрессию <i>WOX5</i>	В <i>pkl</i> мутанте экспрессия <i>WOX5</i> уменьшается примерно на 25 % (Aichinger et al., 2012)
ROW1	Подавляет <i>WOX5</i> в клетках проксимальной меристемы	В <i>row1-3</i> мутанте экспрессия <i>WOX5</i> распространяется вверх от покоящегося центра в проксимальную меристему (Zhang et al., 2015)
MINU1 и MINU2	Сложная регуляция экспрессии <i>WOX5</i>	В <i>minu1 minu2</i> мутантах уровень <i>WOX5</i> экспрессии увеличен, но основная экспрессия локализована не в покоящемся центре, а в клетках над ним, в то время как в покоящемся центре экспрессия ослаблена (Sang et al., 2012)
Транскрипционные факторы		
PHB и PHV	Подавляют экспрессию <i>WOX5</i>	В <i>se</i> мутантах уровень <i>mir165/166</i> не достаточен для удаления <i>PHB</i> и <i>PHV</i> транскриптов из базальной части зародыша, и в ней отсутствует экспрессия <i>WOX5</i> (Grigg et al., 2009)
SHR и SCR	Активируют экспрессию <i>WOX5</i>	В <i>shr</i> и <i>scr</i> мутантах экспрессия <i>WOX5</i> уменьшена или не определяется (Sarkar et al., 2007)
Посттранскрипционные и посттрансляционные факторы		
PRL1	Подавляет экспрессию <i>WOX5</i> в меристематической зоне	В мутантах <i>prl1-9</i> домен экспрессии <i>WOX5</i> слегка расширен и уровень экспрессии повышен (Ji et al., 2015)
POL/PLL1	Необходимы для экспрессии <i>WOX5</i>	В двойных мутантах <i>pol pll1</i> <i>WOX5</i> не экспрессируется (Song et al., 2008)
ACR4	Подавляет экспрессию <i>WOX5</i> белка	При добавлении в среду CLE40 пептида, связывающегося с ACR4 в качестве лиганда, ствольные клетки колумеллы вступают в дифференциацию, что позволяет предполагать ограничение функции <i>WOX5</i> белка (Stahl, Simon, 2009)

рактенно для репрессированных генов. Метилирование осуществляют лизин-метилтрансферазы, деметилирование – гистон-деметилазы.

ATX1/SDG27 (Set Domain Protein 27) кодирует H3K4 гистон-метилтрансферазу, активирующую экспрессию генов и в корне во многом определяющую его архитектуру (Napsucially-Mendivil et al., 2014). В 62 % *atx1* мутантов *WOX5* помимо ПЦ экспрессируется также в инициалах сосудистой системы над ПЦ. В боковых корнях первого порядка домен экспрессии поднимается еще выше (к дочерним клеткам инициалей сосудистой системы) и наблюдается чаще (в 82 % боковых корней). ATX1/SDG27 является одним из генов, подавляющих экспрессию *WOX5* вне его домена в ПЦ.

CLF белок группы Polysomb участвует в триметилировании гистона H3 по лизину 27 (H3K27me3) и подавляет активность меристемы (Aichinger et al., 2012). У *clf* мутантов увеличена длина корня и экспрессия *WOX5* в ПЦ. У двойных мутантов *clf wox5* длина корня возвращается к норме, что свидетельствует о том, что подавление активности меристемы белком CLF опосредовано частичным регулированием экспрессии *WOX5*.

В то же время экспрессия *WOX5* примерно на 25 % уменьшается в мутанте по гену другого хроматин-ре моделирующего фактора, PKL (PICKLE), и это сопровождается увеличением уровня H3K27me3 (Aichinger et al., 2012).

Белок Elongator Protein 2 (ELP2), являющийся субъединицей эволюционно консервативного гистон-ацетилтрансферазного комплекса, оказывает активирующее действие на экспрессию не только *WOX5*, но и других генов, ответственных за поддержание ПЦ и HCK, таких как *SHR* и *SCR*, и генов семейства транскрипционных факторов *PLETHORA* (Jia et al., 2015). Это было показано на основании подавления экспрессии генов *WOX5*, *SHR*, *SCR*, *PLT1*, *PLT2* в мутантах *elp2*. Наряду с этим в *elp2* мутантах наблюдаются увеличение числа делений в ПЦ и дифференцировка инициалей колумеллы.

Другой белок, Repressor Of Wuschel 1 (ROW1), также обладающий гистон-ацетилтрансферазной активностью, в отличие от белка ELP2, является супрессором *WOX5* (Zhang et al., 2015). ROW1 регулирует экспрессию гена *WOX5*, связываясь с H3K4me3 гистонами в проксимальном участке промотора. Домен экспрессии ROW1 включает

всю проксимальную меристему над ПЦ. При этом в трансгенной линии растений *WOX5::mCherry-ROW1*, в которой *ROW1* экспрессируется в ПЦ (домене экспрессии *WOX5*), экспрессия *WOX5* полностью подавляется. В *row1* мутантах экспрессия *WOX5* распространяется вверх от ПЦ в проксимальную меристему.

Неканонические хроматин-ремодулирующие SWI/SNF АТФазы MINUSCULE, MINU1 и MINU2 принимают участие в контроле развития апикальной меристемы побега и корня (Sang et al., 2012). Среди двойных мутантов *minu1 minu2* высок процент эмбриональных леталей. Выжившие зародыши дают проростки с аномалиями в развитии апикальных меристем. Экспрессия *WOX5* в корне шестидневного проростка *minu1 minu2* мутанта в 15 раз выше нормы. Домен экспрессии сдвинут вверх и латерально, основная экспрессия *WOX5* реализуется в клетках, расположенных на месте инициалей стебля, в то время как в ПЦ экспрессия очень слабая. Для MINU2 белка показано прямое связывание с промотором гена *WOX5* методом иммунопреципитации хроматина.

Транскрипционные факторы, влияющие на экспрессию *WOX5*

В настоящее время выявлено несколько транскрипционных факторов, участвующих в формировании экспрессии гена *WOX5*. О транскрипционных факторах ауксинового ответа ARF10 и ARF17, подавляющих экспрессию *WOX5* (Ding, Friml, 2010), было сказано выше. Также репрессорами по отношению к *WOX5* являются два ТФ, PHABULOSA (PHB) и PHAVOLUTA (PHV), относящиеся к HD-ZIP III классу ТФ (Grigg et al., 2009). Экспрессия этих генов у арабидопсиса регулируется группой миРНК *mir165/166* (Muller et al., 2016). Во время развития меристемы корня миРНК группы *mir165/166* способствуют прекращению экспрессии генов *HD-ZIP III* семейства в базальной части зародыша (Grigg et al., 2009; Smith, Long, 2010). *SERRATE (SE)*, ген, кодирующий белок, имеющий домен «цинковый палец» (тип структуры белка, стабилизированный одним или двумя ионами цинка), участвует в биогенезе миРНК (Iwata et al., 2013). В *se* мутантах уровень миРНК значительно снижен, PHB и PHV остаются в базальной части зародыша, меристема корня не развивается и отсутствует экспрессия генов *WOX5* и *SCR* (Grigg et al., 2009). В тройном мутанте *se-5 phb-13 phv-11* экспрессия *WOX5* и *SCR* присутствовала, меристема корня и сам корень развивались нормально.

Транскрипция *mir165A mir165B* напрямую регулируется ТФ семейства GRAS – SCR и SHR (Carlsbecker et al., 2010). SHR и SCR являются активаторами *WOX5*, поскольку известно, что экспрессия *WOX5* уменьшена или отсутствует в одиночных мутантах по этим генам (Sarkar et al., 2007). SHR и SCR ингибируют PHB опосредованно через miRNA165/6, следовательно, активация *WOX5* этими двумя факторами может заключаться в подавлении его ингибитора PHB (Carlsbecker et al., 2010).

Все перечисленные выше ТФ, вероятно, действуют на экспрессию *WOX5* опосредованно, поэтому поиск их мишеней – прямых регуляторов транскрипции *WOX5* – в настоящее время является одной из актуальных задач в области генных сетей НСК корня.

Посттранскрипционные и посттрансляционные факторы, влияющие на экспрессию *WOX5*

К посттранскрипционной регуляции относят модификации транскрипта, затрагивающие процессы его созревания (сплайсинг и процессинг) или стабильность мРНК, в том числе и регуляцию с помощью микроРНК, а также посттрансляционную регуляцию активности и стабильности белков.

WD40-белок PRL1, который является субъединицей ядерного сплайсосом-активирующего комплекса (Nineteen Complex, NTC), оказывает подавляющее действие на экспрессию *WOX5*, но активирующее действие на экспрессию генов *PLT1* и *PLT2* (Ji et al., 2015). В шестидневных проростках *prl1-9* мутантов уровень *WOX5* транскрипта в пять раз выше, чем в диком типе. Кроме того в *prl1-9* мутантах домен экспрессии *WOX5* расширен латерально и вверх примерно на один слой клеток.

Фосфатазы типа 2С (PP2C, protein phosphatase type 2C) POLTERGEIST (POL) and POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1) необходимы для формирования и поддержания НСК как корня, так и побега (Song et al., 2008). Зародыши *pll1 pol* мутантов являются эмбриональными летальными, в них не формируются меристемы побега и корня и отсутствует экспрессия *WOX5* в линзообразной апикальной клетке гипофизы. Экспрессия *WOX5* с конститутивного промотора восстанавливала формирование дистальных ствольных клеток и частично проксимальных ствольных клеток в этих зародышах. Ввиду того, что в *pll1 pol* мутантах с первых делений зародыша нарушена также экспрессия гена *PIN1* транспортера ауксина, то можно так же, как и в нескольких случаях, описанных выше, предполагать, что изменения в экспрессии *WOX5* вызваны нарушениями в распределении ауксина. Кроме того, экспрессия *PIN1* активируется транскрипционным фактором ауксинового ответа ARF5/MONOPTEROS (MP) (Wenzel et al., 2007), экспрессия которого, в свою очередь, может регулироваться POL и PLL1 фосфатазами (Gagne et al., 2008). Возможно, что POL и PLL1 фосфатазы играют двойную роль: поддерживают экспрессию *WOX5* и участвуют в формировании распределения ауксина.

Рецептор-киназы семейства CRINKLY4 (CR4), включая ACR4 (CR4 арабидопсиса), имеют сигнальный пептид, внеклеточный домен, трансмембранную спираль и цитоплазматический серин-треонин киназный домен (Cao et al., 2005). ACR4 вместе с другой рецептор-киназой CLAVATA1 формируют гомо- и гетеродимеры, которые в ответ на сигнальный пептид CLE40 контролируют поддержание меристемы корня и экспрессию *WOX5*, выступая как регуляторный контур CLE40-ACR4-CLV1-WOX5 (Stahl, Simon, 2009; Stahl et al., 2013). *ACR4* экспрессируется в первых трех слоях колумеллы (Stahl, Simon, 2009), куда мигрирует *WOX5* белок (Sarkar et al., 2007). ACR4 фосфорилирует белок *WOX5*, связываясь с последовательностью GSAGAALG(pS)FSVK, расположенной на N-конце пептида (Meyer et al., 2015). Предполагается, что фосфорилирование ограничивает мобильность *WOX5* белка (Stahl, Simon, 2009). Внеклеточный пептид CLE40, который отвечает за дифференцировку клеток колумеллы, негативно влияет на экспрессию *WOX5*, активируя его взаимодействие с ACR4.

Поиск регуляторных элементов в промоторах генов *WOX5*

Экспериментально подтвержденных данных о прямых регуляторах транскрипционной активности гена *WOX5* в настоящее время чрезвычайно мало. Прямое взаимодействие с хроматином в районе промотора *WOX5* показано для эпигенетических регуляторов *WOX5*: гистон-ацетилаз трансферазы ROW1, которая специфически связывается с метилированным гистонем H3K4me3, и хроматин-ре-моделирующей АТФазы MINU2 (Sang et al., 2012; Zhang et al., 2015). Какие-либо данные о взаимодействии ТФ с ДНК промотора *WOX5* отсутствуют.

С использованием доступных онлайн-программных пакетов нами был проведен *in silico* анализ 5'-регуляторной области (-1000; +100) гена *WOX5* из 30 видов растений (Доп. материалы 5) с целью предсказания потенциальных *cis*-регуляторных элементов и, соответственно, возможных прямых регуляторов экспрессии *WOX5*. С помощью программы MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) в этих регуляторных районах было найдено более 40 семейств транскрипционных факторов, имеющих предполагаемые сайты связывания. Потенциальные сайты связывания только четырех из этих семейств ТФ были распознаны во всех промоторах 30 видов: АНБР, MADS, MYB и DOF (табл. 2).

Для каждого из распознанных семейств ТФ предсказанные сайты связывания попали в два консервативных участка, выявленных в результате попарного выравнивания 5'-регуляторных последовательностей гена *WOX5* *A. thaliana* (*AtWOX5*) с геномными последовательностями других видов крестоцветных (*Arabidopsis lyrata*, *A. halleri*, *Brassica rapa*, *B. rapa* FPCs, *Capsella rubella*, *C. grandiflora*, *Boechera stricta*, *Thellungiella halophila*) в программе Vista (<http://pipeline.lbl.gov/>) (рис. 2). Представителей семейств транскрипционных факторов АНБР, MADS, DOF и MYB (подсемейства MYBL и MYBS) можно рассматривать как основных кандидатов, способных осуществлять прямую регуляцию экспрессии *WOX5*.

Интересным результатом оказалось наличие среди предсказанных сайтов связывания последовательностей, с которыми связывается белок WUS. Учитывая взаимозаменяемость белков WUS и WOX5, а также то, что *in vitro* ТФ WOX5 риса взаимодействует с сайтами связывания WUS (Kamiya et al., 2003), можно предположить, что WOX5 способен осуществлять регуляцию экспрессии своего же гена.

Такие ТФ, как АТНВ1, АТНВ5, АТНВ8, REV, FLC, SOC1, WER, PHR1, DOF1 и DOF2, экспрессируются в корне (см. табл. 2). Кроме того, ТФ АТНВ8 и REV являются гомологами РНВ и РНУ, которые подавляют экспрессию *WOX5* (Grigg et al., 2009).

ТФ семейства MADS наиболее широко описаны как регуляторы цветения у растений (Ng, Yanofsky, 2001), однако они контролируют и другие программы развития, в частности формирование корней (Liu et al., 2015; Yu et al., 2015). Представители семейства MYB известны как регуляторы клеточного цикла. Для некоторых из них показано участие в подавлении клеточных делений в ПЦ (Vilarrasa-Blasi et al., 2014).

Таким образом, экспрессия в корне ТФ АТНВ1, АТНВ5, АТНВ8, REV, FLC, SOC1, WER, PHR1, DOF1 и DOF2,

наряду с наличием их потенциальных сайтов связывания в промоторах всех исследованных *WOX5* генов, и консервативность районов локализации этих сайтов у крестоцветных указывают на возможное участие перечисленных факторов в прямой регуляции экспрессии гена *WOX5*, что позволяет рекомендовать их для экспериментальной проверки.

Гены-мишени транскрипционного фактора *WOX5*

Функция WOX5 как регулятора транскрипции постулируется преимущественно на основании его первичной структуры. Помимо гомеодомена – характерной черты целого ряда ТФ – WOX5 содержит ранее охарактеризованные у других белков домены-репрессоры WUS-бокс и EAR мотив (Haecker et al., 2004; Gao et al., 2014), для каждого из которых способность подавлять транскрипцию генов была показана экспериментально (Hiratsu et al., 2003; Ikeda et al., 2009). Между гомеодоменом и WUS-боксом располагается небольшой участок, состоящий из кислых аминокислот, – потенциальный активатор транскрипции (Ikeda et al., 2009; van der Graaff et al., 2009). В то же время имеются некоторые экспериментальные данные, описывающие участие WOX5 в регуляции транскрипции генов и специфическую роль его функциональных доменов в этом процессе.

В частности, недавно было показано, что белок WOX5 в составе комплекса с корепрессорами TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR) и гистон-деацетилазой HDA19 подавляет экспрессию гена *CDF4* в клетках ПЦ и инициалах колумеллы у *A. thaliana* путем деацетилирования гистонов в проксимальном районе промотора *CDF4* (Pi et al., 2015). Ген *CDF4* кодирует ТФ, который способствует дифференцировке клеток колумеллы, и уровень его возрастает по градиенту: от отсутствия экспрессии в покоящемся центре и низкого уровня экспрессии в ствольных клетках колумеллы до высокого уровня экспрессии в дифференцированных клетках колумеллы. Ключевую роль для реализации WOX5-опосредованного подавления экспрессии *CDF4* играет домен WUS-бокс, тогда как EAR мотив значительного влияния на репрессию не оказывает. Связывание WOX5 с промотором *CDF4* происходит по последовательности, в центре которой находится АТТА. Эта последовательность комплементарна коровой последовательности сайта связывания *AtWUS* ТААТ (Lohmann et al., 2001; Yadav et al., 2011). Возможно, что ТФ WUS и WOX5 имеют одну и ту же коровую последовательность в своих сайтах связывания ТААТ/АТТА. По крайней мере, было показано, что WOX5 риса (*OsWOX5*) специфически взаимодействует *in vitro* с сайтом связывания ТФ *AtWUS* (ТААТGG) в промоторе гена арабидопсиса *AGAMOUS* (Kamiya et al., 2003).

WOX5 подавляет экспрессию гена *CYCD3;3*, который контролирует G1-S переход в клеточном цикле, что обеспечивает низкую митотическую активность клеток ПЦ (Forzani et al., 2014). Взаимодействие белка WOX5 с промотором гена *CYCD3;3* было показано с использованием методов иммунопреципитации хроматина и количественной ПЦР (ChIP/qPCR).

Помимо охарактеризованных выше прямых мишеней WOX5, на основании молекулярно-генетических исследова-

Таблица 2. Транскрипционные факторы, сайты связывания которых выявлены в 5'-регуляторных областях (-1000; +100 п. н. относительно старта транскрипции) генов *WOX5* с помощью программы MatInspector (<http://www.genomatix.de/>)

Семейство и названия транскрипционных факторов	Факторы, экспрессирующиеся в корне или гипокотиле*
ATHB: ATHB1, 5, 8 (<i>Arabidopsis thaliana</i> Homeobox 1, 5, 8), REV (REVOLUTA), BLR (BELLRINGER), WUS (WUSCHEL)	ATHB1 – в гипокотиле, сосудистой системе и кончике корня (Capella et al., 2015). ATHB5 – в гипокотиле (наиболее интенсивно на границе с корнем), в сосудистой системе корня в зоне дифференциации и слабо – в эпидермисе (Johannesson et al., 2003). ATHB8 – в меристеме и элонгационной зоне корня, а также в прокамии и колумелле (Baima et al., 1995). REV – в ксилеме и камбии, а также в примордиях боковых корней (Hawker, Bowman, 2004)
MADS: FLC (Flowering Locus C), SOC1 (Suppressor of Overexpression of Constans 1), AG (AGAMOUS), AP1 (APETALA1), AP3 (APETALA3)	FLC – в кончике корня (Michaels, Amasino, 2000). SOC1 – в меристеме корня (Lee, Lee, 2010)
MYB: WER (WEREWOLF), PHR1 (Phosphate Starvation Response 1)	WER – в развивающихся атрихобластах корней и в неустычных клетках гипокотила (Lee, Schiefelbein, 1999). PHR1 – в корнях (Rubio et al., 2001)
DOF: DOF1 , DOF2 (DNA binding with one zinc finger 1, 2)	DOF1 и DOF2 – в сосудистой системе гипокотила и корня (Ward et al., 2005; Skirycz et al., 2006)

*Выделены факторы, экспрессирующиеся в корне.

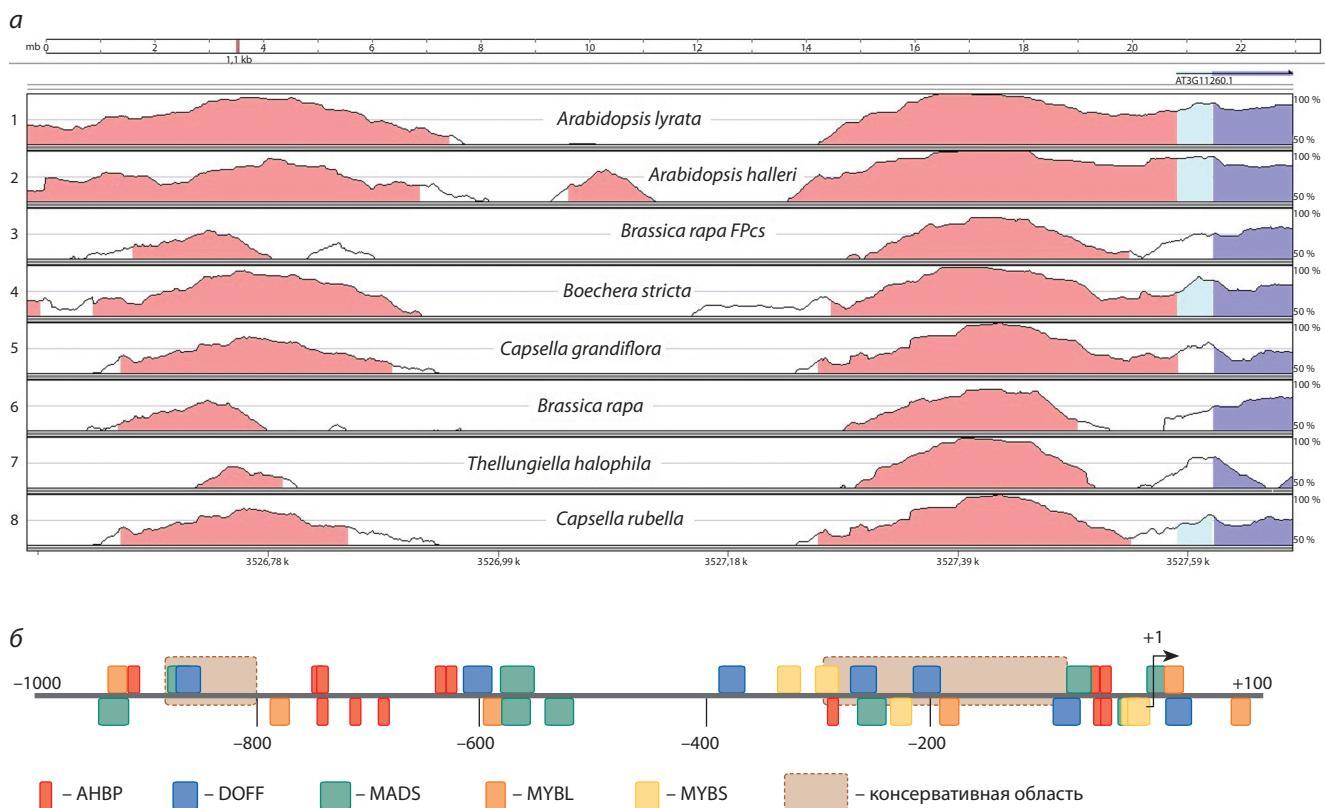


Рис. 2. Анализ промоторных областей гена *WOX5* разных видов семейства крестоцветных.

а – выравнивание нуклеотидной последовательности 5'-регуляторной области (от -1000 до +100 п. н. относительно старта транскрипции) *AtWOX5* попарно с последовательностями промоторов *WOX5* других видов семейства крестоцветных в программе Vista (<http://pipeline.lbl.gov/>). Фиолетовый цвет – экзоны, голубой – нетранслируемые районы, красный – последовательности промоторов. Были выявлены две консервативные области в промоторном районе *AtWOX5*: от -70 до -300 и от -800 до -870 п. н. (относительно старта транскрипции); *б* – анализ 5'-регуляторной области *AtWOX5* в программе Genomatix MatInspector (<http://www.genomatix.de/>), позволяющей проводить *in silico* поиск сайтов связывания ТФ с использованием базы данных цис-регуляторных элементов. Всего было найдено более 40 семейств ТФ, имеющих предполагаемые сайты связывания в исследованных последовательностях. Из них были выбраны представленные на рисунке семейства ТФ, поскольку они присутствовали во всех проанализированных *WOX5* промоторах из 30 видов растений. Сайты связывания этих четырех семейств ТФ попадают в консервативную область, выявленную на основании попарного выравнивания промоторной последовательности *AtWOX5* с промоторными последовательностями *WOX5* генов других видов семейства крестоцветных.

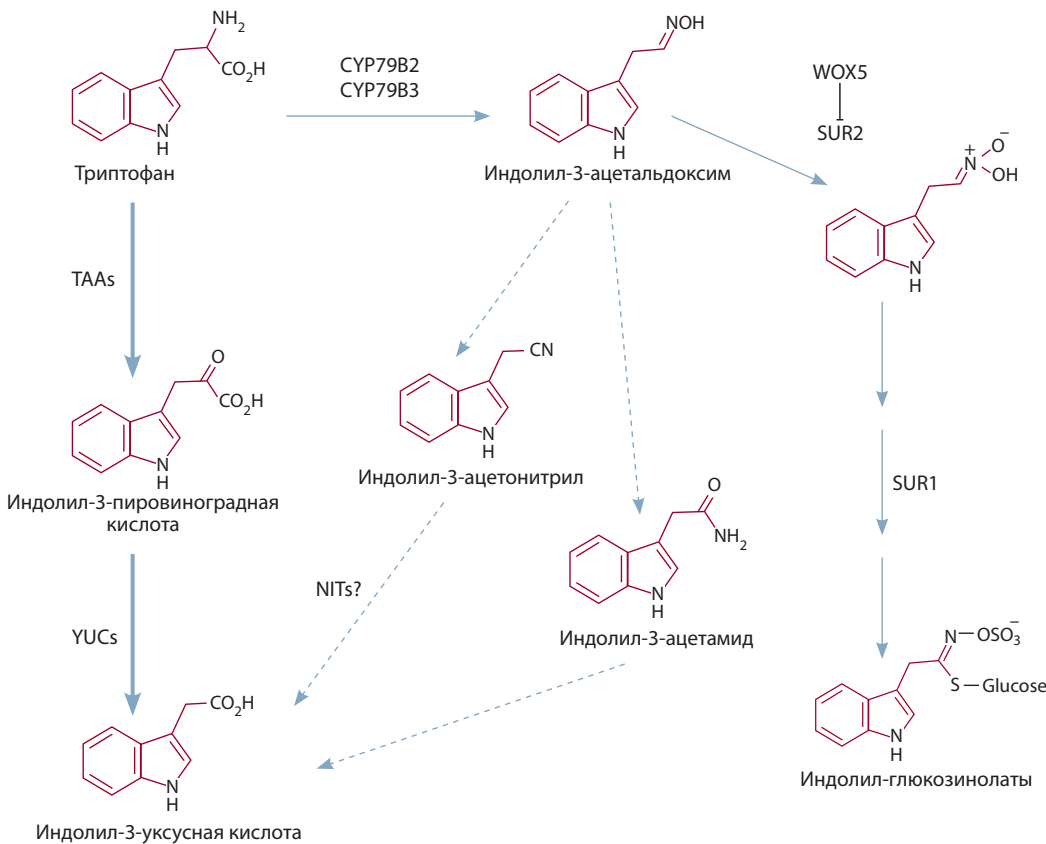


Рис. 3. Схема синтеза ауксина (индоллил-3-уксусной кислоты) и индоллил-глюкозинолатов.

Толстые серые стрелки – основной путь синтеза ауксина из триптофана у растений с участием ферментов TAA (триптофан аминотрансфераза арабидопсиса) и YUCCA (YUC, флавиносодержащая монооксигеназа). Тонкие серые стрелки – путь синтеза индоллил-глюкозинолатов из триптофана с участием ферментов CYP79B2, CYP79B3 и SUR2/ CYP83B1 (цитохром P450 монооксигеназ) и SUPERROOT1 (SUR1, C-S лиазы). Пунктирные серые стрелки – предполагаемый альтернативный путь синтеза ауксина из предшественника индоллил-глюкозинолатов индоллил-3-ацетальдоксима.

дований описано влияние этого ТФ на активность целого ряда ключевых факторов поддержания НСК, хотя прямое взаимодействие *WOX5* с регуляторными районами соответствующих генов экспериментально исследовано не было. С помощью Т-ДНК инсерции был получен *tin* (turanose-insensitive) мутант по гену *WOX5* (Gonzali et al., 2005). Кодировочная часть гена *WOX5* (*AT3G11260*) состоит из двух экзонов и интрона. Инсерция Т-ДНК произошла в конце второго экзона. Наряду с этим по месту инсерции выявлена транслокация гена *AT1G48610*, кодирующего неизвестный белок. В результате с промотора *WOX5* гена считывается химерный транскрипт, чья мРНК после сплайсинга состоит из 5'-нетранслируемой области гена *WOX5* и его белок-кодирующей последовательности без 68 последних нуклеотидов до стоп-кодона, за которой следует мРНК *AT1G48610* начиная с шести нуклеотидов конца 3'-нетранслируемой области этого гена. Ввиду того, что *tin* мутант восстанавливается до дикого типа сверхэкспрессией гена *WOX5*, он рассматривается как мутант по этому гену. В *tin* мутанте значительно повышен уровень мРНК гена *SUPERROOT2* (*SUR2*), по сравнению с диким типом. Из этого следует, что белок, считываемый с химерного транскрипта, не подавляет экспрессию гена

SUR2. В диком типе подавление экспрессии осуществляется белком *WOX5* напрямую или через посредников. Ген *SUR2* участвует в биосинтезе ауксина (Mikkelsen et al., 2004). На рис. 3 изображена схема основных путей синтеза ауксина из триптофана у растений. В настоящее время показано, что основным путем биосинтеза ауксина, т.е. индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК), из триптофана является TAA (триптофан аминотрансфераза арабидопсиса)/YUCCA (YUC, флавиносодержащая монооксигеназа) или IPA (индоллил-3-пируват) путь (Mashiguchi et al., 2011; Won et al., 2011). Второй путь идет через конверсию триптофана в IAOx (индоллил-3-ацетальдоксим), осуществляемую двумя цитохром P450 монооксигеназами, CYP79B2 и CYP79B3. У двойного мутанта по генам, кодирующим эти ферменты, уменьшен общий пул ИУК и фенотип соответствует растениям с частично сниженным содержанием ауксина (уменьшение длины растения, гипокотыля, черешков листьев и самих листьев) (Zhao et al., 2002). Индоллил-3-ацетальдоксим является предшественником как ИУК, так и индоллил-глюкозинолатов, вторичных метаболитов, осуществляющих защитные функции у растений (Kasahara, 2016). Активация гена *SUR2* переключает IAOx-путь на синтез индоллил-глюкозинолатов,

подавление гена *SUR2* – на дополнительный к основному IPA пути синтез ИУК. Таким образом, *WOX5* напрямую или через посредников осуществляет это переключение. Интересно отметить, что IAOx путь имеется только у некоторых видов растений. До настоящего времени гены *CYP79B2* и *CYP79B3* были найдены у крестоцветных, гороха и табака (Quittenden et al., 2009; Sugawara et al., 2009; Nonhebel et al., 2011).

WOX5 является также активатором гена *PLT1*, одного из основных регуляторов гомеостаза НСК в корне, необходимого (наряду с *PLT2*) для поддержания активности и правильной локализации ПЦ в кончике корня (Ding, Friml, 2010). Так, у мутантов *A. thaliana* с потерей функции *WOX5* происходит заметное подавление активности *PLT1*, а при индукции 35S:WOX5-GR уровень *PLT1* транскрипта значительно увеличивается. Ввиду того, что для этого увеличения требуется продолжительная индукция, можно полагать, что регуляция происходит не напрямую, а при участии дополнительных факторов.

Ген *SOMBRERO (SMB)*, содержащий NAC-домен, отвечает за выход дочерних клеток инициалей колумеллы из стадии деления и их дифференцировку (Willemsen et al., 2008; Bennett et al., 2010). В *wox5-1* мутанте экспрессия *SMB* перемещается на один слой вверх в инициали колумеллы (Bennett et al., 2014). Через 4 ч после индукции 35S:WOX5-GR экспрессия *SMB* в колумелле существенно уменьшается и исчезает после 24 ч индукции. Таким образом, *WOX5* подавляет экспрессию *SMB* не только в ПЦ, где он экспрессируется, но и в инициалах колумеллы за счет миграции *WOX5* белка.

Генетические исследования и анализ экспрессии свидетельствуют о наличии прямых мишеней *WOX5* и мишеней второго порядка как в генной сети регуляции дифференцировки клеток колумеллы, так и в генной сети поддержания пула стволовых клеток меристемы корня в целом. Для большинства этих мишеней точные детали осуществления этой регуляции пока неизвестны.

Заключение

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о ключевой роли гена *WOX5* как в дифференцировке клеток колумеллы, так и в поддержании пула стволовых клеток в АМ корня. Точные механизмы осуществления этих функций *WOX5* и регуляции активности самого гена в большинстве случаев неизвестны.

В данной работе наряду с обзором опубликованных данных мы провели филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков *WOX5* разных видов растений, который показал консервативность этих последовательностей, а также специфические особенности у некоторых видов, связанные как с эволюционным порядком, так и с определенными условиями обитания этих видов.

Среди ТФ, для которых удалось провести поиск сайтов связывания, выделены наиболее вероятные кандидаты в регуляторы *WOX5*, так как их сайты связывания присутствуют во всех исследованных промоторах 30 видов растений и располагаются в консервативных участках. Это белки пяти семейств ТФ: АНБР, MADS, MYBL, MYBS,

DOFF. Среди найденных потенциальных регуляторных элементов есть сайты связывания, с которыми *WOX5* предположительно может связываться и осуществлять регуляцию экспрессии собственного гена.

Благодарности

Работа поддержана грантом РНФ № 14-14-00734 (филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков *WOX5* разных видов и поиск консервативных областей и сайтов связывания различных ТФ в промоторах их генов) и бюджетным финансированием по государственному заданию (проект № 0324-2015-0003 (интеграция и анализ опубликованных данных)).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Поплавская Г.И. Водные растения. М.: Сов. энцикл., 1971. Т. 5.
- Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., Laux T. Plant stem cell niches. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2012;63:615-636. DOI 10.1146/annurev-arplant-042811-105555.
- Atta R., Laurens L., Boucheron-Dubuisson E., Guivarc'h A., Carneiro E., Giraudat-Pautot V., Rech P., Chriqui D. Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *Plant J.* 2009;57:626-644. DOI 10.1111/j.1365-313x.2008.03715.x.
- Baima S., Nobili F., Sessa G., Lucchetti S., Ruberti I., Morelli G. The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in Arabidopsis thaliana. *Development.* 1995;121(12):4171-4182.
- Bennett T., van den Toorn A., Sanchez-Perez G.F., Campilho A., Willemsen V., Snel B., Scheres B. SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2010;22:640-654.
- Bennett T., van den Toorn A., Willemsen V., Scheres B. Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development.* 2014;141(21):4055-4064. DOI 10.1242/dev.110148.
- Boyer F., Simon R. Asymmetric cell divisions constructing Arabidopsis stem cell niches: the emerging role of protein phosphatases. *Plant Biol. (Stuttg.)* 2015;17(5):935-945. DOI 10.1111/plb.12352.
- Breuninger H., Rikirsch E., Hermann M., Ueda M., Laux T. Differential expression of WOX genes mediates apical-basal axis formation in the Arabidopsis embryo. *Dev. Cell.* 2008;14(6):867-876.
- Brunoud G., Wells D.M., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V., Burrow A.H., Beeckman T., Kepinski S., Traas J., Bennett M.J., Vernoux T. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature.* 2012;482(7383):103-106.
- Cao X., Li K., Suh S.G., Guo T., Becraft P.W. Molecular analysis of the CRINKLY4 gene family in Arabidopsis thaliana. *Planta.* 2005;220(5):645-657.
- Capella M., Ribone P.A., Arce A.L., Chan R.L. Arabidopsis thaliana HomeoBox 1 (AtHB1), a HomeoDomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation. *New Phytol.* 2015;207(3):669-682.
- Carlsbecker A., Lee J.Y., Roberts C.J., Dettmer J., Lehesranta S., Zhou J., Lindgren O., Moreno-Risueno M.A., Vatén A., Thitamadee S., Campilho A., Sebastian J., Bowman J.L., Helariutta Y., Benfey P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature.* 2010;465(7296):316-321.
- Chatfield S.P., Capron R., Severino A. Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J.* 2013;73:798-813.

- Che P., Lall S., Howell S.H. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in Arabidopsis tissue culture. *Planta*. 2007;226:1183-1194. DOI 10.1007/s00425-007-0565-4.
- Chen S.K., Kurdyukov S., Kereszt A., Wang X.D., Gresshoff P.M., Rose R.J. The association of homeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula*. *Planta*. 2009;230(4):827-840. DOI 10.1007/s00425-009-0988-1.
- Clapier C.R., Cairns B.R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 2009;78:273-304.
- Clark N.M., de Luis Balaguer M.A., Sozzani R. Experimental data and computational modeling link auxin gradient and development in the *Arabidopsis root*. *Front. Plant. Sci.* 2014;5:328. DOI 10.3389/fpls.2014.00328.
- Della Rovere F., Fattorini L., D'Angeli S., Velocchia A., Falasca G., Altamura M.M. Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 2013;112(7):1395-1407. DOI 10.1093/aob/mct215.
- Ding Z., Friml J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis roots*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2010;107(26):12046-12051.
- Ditengou F.A., Teale W.D., Kochersperger P., Flittner K.A., Kneuper I., van der Graaff E., Nziengui H., Pinosa F., Li X., Nitschke R., Laux T., Palme K. Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;2;105(48):18818-18823. DOI 10.1073/pnas.0807814105.
- Dorantes-Acosta A.E., Vielle-Calzada J.P. The male gametophytic mutant *tepitzin1* indicates a requirement of the homeobox gene *WOX5* for pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Sex. Plant Reprod.* 2006;1;19(4):163-173.
- Duvall M.R., Learn G.H. Jr, Eguiarte L.E., Clegg M.T. Phylogenetic analysis of *rbcL* sequences identifies *Acorus calamus* as the primal extant monocotyledon. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993;15;90(10):4641-4644.
- Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W., Murray J.A. *WOX5* suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol.* 2014;24(16):1939-1944. DOI 10.1016/j.cub.2014.07.019.
- Gagne J.M., Song S.K., Clark S.E. *POLTERGEIST* and *PLL1* are required for stem cell function with potential roles in cell asymmetry and auxin signaling. *Commun. Integr. Biol.* 2008;1(1):53-55.
- Gao B., Wen C., Fan L., Kou Y., Ma N., Zhao L. A *Rosa canina* *WUSCHEL*-related homeobox gene, *RcWOX1*, is involved in auxin-induced rhizoid formation. *Plant Mol. Biol.* 2014;86(6):671-679. DOI 10.1007/s11103-014-0255-0.
- Gaut B.S., Doebley J.F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997;94(13):6809-6814.
- Gonzali S., Novi G., Loreti E., Paolicchi F., Poggi A., Alpi A., Perata P. A turanose-insensitive mutant suggests a role for *WOX5* in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2005;44(4):633-645.
- Grigg S.P., Galinha C., Kornet N., Canales C., Scheres B., Tsiantis M. Repression of apical homeobox genes is required for embryonic root development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2009;19(17):1485-1490.
- Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 2004;131(3):657-668.
- Haider N. The origin of the B-genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetika.* 2013;49(3):303-314.
- Hawker N.P., Bowman J.L. Roles for class III HD-Zip and *KANADI* genes in *Arabidopsis* root development. *Plant Physiol.* 2004;135(4):2261-2270.
- He C., Chen X., Huang H., Xu L. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluri potency from cultured *Arabidopsis* tissues. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002911. DOI 10.1371/journal.pgen.1002911.
- Hedman H., Zhu T., von Arnold S., Sohlberg J.J. Analysis of the *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX* gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *BMC Plant Biol.* 2013;13:89. DOI 10.1186/1471-2229-13-89.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T., Ohme-Takagi M. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2003;34(5):733-739.
- Ikeda M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M. *Arabidopsis* *WUSCHEL* is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning. *Plant Cell.* 2009;21(11):3493-3505. DOI 10.1105/tpc.109.069997.
- Imin N., Nizamidin M., Wu T., Rolfe B.G. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 2007;58(3):439-451.
- Iwata Y., Takahashi M., Fedoroff N.V., Hamdan S.M. Dissecting the interactions of *SERRATE* with RNA and *DICER-LIKE 1* in *Arabidopsis* microRNA precursor processing. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(19):9129-9140. DOI 10.1093/nar/gkt667.
- Ji H., Wang S., Li K., Szakonyi D., Koncz C., Li X. *PRL1* modulates root stem cell niche activity and meristem size through *WOX5* and *PLTs* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2015;81(3):399-412.
- Jia Y., Tian H., Li H., Yu Q., Wang L., Friml J., Ding Z. The *Arabidopsis thaliana* elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development. *J. Exp. Bot.* 2015. DOI 10.1093/jxb/erv230.
- Johannesson H., Wang Y., Hanson J., Engström P. The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *ATHB5* is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol. Biol.* 2003;51(5):719-729.
- Joshi T., Valliyodan B., Wu J.H., Lee S.H., Xu D., Nguyen H.T. Genomic differences between cultivated soybean, *G. max* and its wild relative *G. soja*. *BMC Genomics.* 2013;14(1):S5. DOI 10.1186/1471-2164-14-S1-S5.
- Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y., Matsuoka M. Isolation and characterization of a rice *WUSCHEL*-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J.* 2003;35(4):429-441.
- Kasahara H. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Biosci. Biotech. Bioch.* 2016;80(1):34-42.
- Kita Y., Kato M. Seedling developmental anatomy of an undescribed Malacotristicha species (Podostemaceae, subfamily Tristichoidae) with implications for body plan evolution. *Plant Syst. Evol.* 2005;1;254(3-4):221-232.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. *MEGA7*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;22.
- Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 2014;65(3):799-807.
- Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jürgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development.* 1996;122:87-96.
- Lee J., Lee I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* 2010;61(9):2247-2254.
- Lee M.M., Schiefelbein J. *WEREWOLF*, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell.* 1999;99(5):473-483.
- Lian G., Ding Z., Wang Q., Zhang D., Xu J. Origins and evolution of *WUSCHEL*-related homeobox protein family in plant kingdom. *Sci. World J.* 2014;2014:534140. DOI 10.1155/2014/534140.
- Liu W., Han X., Zhan G., Zhao Z., Feng Y., Wu C. A novel sucrose-regulatory MADS-box transcription factor *GmNMHC5* promotes root development and nodulation in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(9):20657-20673. DOI 10.3390/ijms160920657.
- Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R., Weigel D. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell.* 2001;105(6):793-803.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanadaa A., Yaeno T., Shirasua K., Yaod H., McStend P., Zhaoe Y., Hayashif K., Kamiyaa Y., Kasahara H. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2011;108(45):18512-18517.

- Mayer K.F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jürgens G., Laux T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*. 1998;95(6):805-815.
- Meyer M.R., Shah S., Zhang J., Rohrs H., Rao A.G. Evidence for intermolecular interactions between the intracellular domains of the Arabidopsis receptor-like kinase ACR4, its homologs and the *WOX5* transcription factor. *PLoS ONE*. 2015;10(3). DOI 10.1371/journal.pone.0118861.
- Michaels S.D., Amasino R.M. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ*. 2000;23(11):1145-1153.
- Mikkelsen M.D., Naur P., Halkier B.A. Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J*. 2004;37(5):770-777.
- Muller B., Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. 2008; 453(7198): 1094-1097. DOI 10.1038/nature06943.
- Muller C.J., Valdes A.E., Wang G., Ramachandran P., Beste L., Uddenberg D., Carlsbecker A. PHABULOSA mediates an auxin signaling loop to regulate vascular patterning in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2016;170(2):956-970. DOI 10.1104/pp.15.01204.
- Napsucially-Mendivil S., Alvarez-Venegas R., Shishkova S., Dubrovsky J.G. Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *J. Exp. Bot*. 2014. DOI 10.1093/jxb/eru355.
- Nardmann J., Reisewitz P., Werr W. Discrete shoot and root stem cell-promoting *WUS/WOX5* functions are an evolutionary innovation of angiosperms. *Mol. Biol. Evol*. 2009;26(8):1745-1755. DOI 10.1093/molbev/msp084.
- Nardmann J., Werr W. The invention of *WUS*-like stem cell-promoting functions in plants predates leptosporangiate ferns. *Plant. Mol. Biol*. 2012;78(1-2):123-134. DOI 10.1007/s11103-011-9851-4.
- Nardmann J., Zimmermann R., Durantini D., Kranz E., Werr W. *WOX* gene phylogeny in *Poaceae*: a comparative approach addressing leaf and embryo development. *Mol. Biol. Evol*. 2007;24(11): 2474-2484.
- Ng M., Yanofsky M.F. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev. Genet*. 2001;2(3):186-195.
- Nonhebel H., Yuan Y., Al-Amier H., Pieck M., Akor E., Ahamed A., Cohen J.D., Celenza J.L., Normanly J. Redirection of tryptophan metabolism in tobacco by ectopic expression of an Arabidopsis indolic glucosinolate biosynthetic gene. *Phytochemistry*. 2011;72(1): 37-48.
- Olsen J.L., Rouzé P., Verhelst B., Lin Y.C., Bayer T., Collen J., Dattolo E., De Paoli E., Dittami S., Maumus F., Michel G., Kersting A., Lauritano C., Lohaus R., Töpel M., Tonon T., Vanneste K., Amirebrahimi M., Brakel J., Boström C., Chovatia M., Grimwood J., Jenkins J.W., Jueterbock A., Mraz A., Stam W.T., Tice H., Bornberg-Bauer E., Green P.J., Pearson G.A., Procaccini G., Duarte C.M., Schmutz J., Reusch T.B., Van de Peer Y. The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature*. 2016;18(530(7590)):331-335. DOI 10.1038/nature16548.
- Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. Wuschel-related homeobox5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol*. 2012;158(3):1329-1341. DOI 10.1104/pp.111.188078.
- Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E. Organizer-derived *WOX5* signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of *CDF4* expression. *Dev. Cell*. 2015;33(5):576-588. DOI 10.1016/j.devcel.2015.04.024.
- Qiu Y.L., Dombrowska O., Lee J., Li L., Whitlock B.A., Bernasconi-Quadroni F., Rest J.S., Davis C.C., Borsch T., Hilu K.W., Renner S.S. Phylogenetic analyses of basal angiosperms based on nine plastid, mitochondrial, and nuclear genes. *Int. J. Plant Sci*. 2005;166(5): 815-842.
- Quittenden L.J., Davies N.W., Smith J.A., Molesworth P.P., Tivendale N.D., Ross J.J. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol*. 2009;151(3):1130-1138.
- Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A.C., Iglesias J., Leyva A., Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*. 2001;15(16):2122-2133.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfelt J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell*. 1999;99(5):463-472.
- Sablowski R. Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 2011;14(1):4-9. DOI 10.1016/j.pbi.2010.08.001.
- Sang Y., Silva-Ortega C.O., Wu S., Yamaguchi N., Wu M.F., Pfluger J., Gillmor C.S., Gallagher K.L., Wagner D. Mutations in two non-canonical Arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases cause embryogenesis and stem cell maintenance defects. *Plant J*. 2012;72(6):1000-1014.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*. 2007;446:811-814. DOI 10.1038/nature05703.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot*. 2013;64(9):2565-2577.
- Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007;8:345-354.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C., Weisbeek P. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*. 1994;120:2475-2478.
- Sharma S.K., Yamamoto M., Mukai Y. Immuno-cytogenetic manifestation of epigenetic chromatin modification marks in plants. *Planta*. 2015;241:291-301.
- Skirycz A., Reichelt M., Burow M., Birkemeyer C., Rolcik J., Kopka J., Zanor M.I., Gershenzon J., Strnad M., Szopa J., Mueller-Roeber B., Witt I. DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J*. 2006;47(1):10-24.
- Smith Z.R., Long J.A. Control of Arabidopsis apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*. 2010; 464(7287):423-426.
- Song S.K., Hoffhuis H., Lee M.M., Clark S.E. Key divisions in the early Arabidopsis embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev. Cell*. 2008;15(1):98-109.
- Soukup A., Seago J.L. Jr., Votrubová O. Developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, *Acorus calamus* (Acorales, Acoraceae). *Ann. Bot*. 2005;96(3):379-385.
- Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K.G., Kirschner G.K., Schmid J.B., Wink R.H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C.A., Simon R. Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol*. 2013;23(5):362-371.
- Stahl Y., Simon R. Is the Arabidopsis root niche protected by sequestration of the CLE40 signal by its putative receptor ACR4? *Plant Signal. Behav*. 2009;4(7):634-635.
- Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y., Kasahara H. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2009;106(13):5430-5435.
- Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root developmental pathway. *Dev. Cell*. 2010;18:463-471.
- Tian H., Jia Y., Niu T., Yu Q., Ding Z. The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*. 2014a;33(5):745-753.
- Tian H., Wabnik K., Niu T., Li H., Yu Q., Pollmann S., Vanneste S., Govaerts W., Rolcik J., Geisler M., Friml J., Ding Z. *WOX5*-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for

- the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*. 2014b;7(2):277-289.
- Van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P., Scheres B. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*. 1997;390(6657):287-289.
- Van der Graaff E., Laux T., Rensing S.A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol*. 2009;10:248. DOI 10.1186/gb-2009-10-12-248.
- Vilarrasa-Blasi J., González-García M.P., Frigola D., Fàbregas N., Alexiou K.G., López-Bigas N., Rivas S., Jauneau A., Lohmann J.U., Benfey P.N., Ibañez M., Caño-Delgado A.I. Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Dev. Cell*. 2014;30(1):36-47. DOI 10.1016/j.devcel.2014.05.020.
- Vinogradova A.P., Lebedeva M.A., Lutova L.A. Meristematic characteristics of tumors initiated by *Agrobacterium tumefaciens* in pea plants. *Russ. J. Genet*. 2015;51(1):46-54.
- Ward J.M., Cufu C.A., Denzel M.A., Neff M.M. The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2005;17(2):475-485.
- Wenzel C.L., Schuetz M., Yu Q., Mattsson J. Dynamics of MONOPTEROS and PIN-FORMED1 expression during leaf vein pattern formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2007;49(3):387-398.
- Willemsen V., Bauch M., Bennett T., Campilho A., Wolkenfelt H., Xu J., Haseloff J., Scheres B. The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Dev. Cell*. 2008;15:913-922.
- Won C., Shen X., Mashiguchi K., Zheng Z., Dai X., Cheng Y., Kasahara H., Kamiya Y., Chory J., Zhao Y. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2011;108(45):18518-18523. DOI 10.1073/pnas.1108436108.
- Yadav R.K., Perales M., Gruel J., Girke T., Jönsson H., Reddy G.V. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes. Dev*. 2011;25(19):2025-2030. DOI 10.1101/gad.17258511.
- Yadav R.K., Tavakkoli M., Reddy G.V. WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. 2010;137(21):3581-3589. DOI 10.1242/dev.054973.
- Yu C., Liu Y., Zhang A., Su S., Yan A., Huang L., Ali I., Liu Y., Forde B.G., Gan Y. MADS-box transcription factor OsMADS25 regulates root development through affection of nitrate accumulation in rice. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0135196. DOI 10.1371/journal.pone.0135196.
- Zhang W., Swarup R., Bennett M., Schaller G.E., Kieber J.J. Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem. *Curr. Biol*. 2013;23(20):1979-1989.
- Zhang Y., Jiao Y., Liu Z., Zhu Y.X. ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat. Commun*. 2015. DOI 10.1038/ncomms7003.
- Zhao S., Jiang Q.T., Ma J., Zhang X.W., Zhao Q.Z., Wang X.Y., Wang C.S., Cao X., Lu Z.X., Zheng Y.L., Wei Y.M. Characterization and expression analysis of *WOX5* genes from wheat and its relatives. *Gene*. 2014;537(1):63-69. DOI 10.1016/j.gene.2013.12.022.
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J., Ecker J.R., Normanly J., Chory J., Celenza J.L. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Gene Dev*. 2002;16:3100-3112.

Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений

А.В. Кочетов , В.К. Шумный

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В настоящее время трансгенные растения широко используются как для изучения функций отдельных генов, так и для реконструкции сетей взаимодействующих генов, контролирующих формирование морфологических, биохимических и физиологических признаков в процессе развития и при воздействии внешних факторов различной природы. В статье обсуждается классический инструментарий геной инженерии, позволяющий получать линии растений с измененными параметрами экспрессии гена-мишени. Описана структура генетических конструкций (экспрессия белок-кодирующего трансгена, антисмысловых и дцРНК-супрессоров). В качестве примера рассмотрены трансгенные растения, характеризующиеся увеличенным или сниженным уровнем экспрессии генов S-подобных рибонуклеаз, а также сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы, отвечающего за катаболизм пролина. Функции S-подобных РНКаз связывали главным образом с ремобилизацией фосфата из стареющих и отмирающих частей растений, однако паттерн экспрессии некоторых генов из этой группы предполагал возможность их участия в защите от патогенов (индукция при повреждении тканей в районе повреждения (локально) и в удаленных органах (системно)). Кроме того, некоторые белки семейства PR-4 (pathogenesis-related proteins 4) обладают рибонуклеазной и противогрибковой активностью. Исследование трансгенных линий растений табака показало, что повышенная РНКазная активность в апопласте приводит к повышению устойчивости к вирусу табачной мозаики, что говорит о новой функции S-подобных рибонуклеаз, связанной с участием в системе неспецифической защиты от вирусов. Другой набор линий трансгенных растений содержал антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы (ПДГ) на основе сегмента гена арабидопсиса. Использование этой генетической конструкции для получения трансгенных растений других видов (табака, кукурузы, подсолнечника) приводило к умеренному снижению активности ПДГ и повышению содержания пролина в норме в 1,5–3 раза. Оказалось, что при этом также повышается устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов (засуха, засоление, холод, соли тяжелых металлов), что может быть связано с защитным действием пролина на ранних этапах неблагоприятных воздействий, предотвращающим повреждение белков клеточного аппарата экспрессии свободными радикалами.

Ключевые слова: растения; геной инженерия; устойчивость к патогенам; стрессоустойчивость; пролин; рибонуклеазы.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):475-481. DOI 10.18699/VJ16.179

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kochetov A.V., Shumny V.K. Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):475-481. DOI 10.18699/VJ16.179

УДК 631.523

Поступила в редакцию 18.07.2016 г.

Принята к публикации 19.08.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

 e-mail: ak@bionet.nsc.ru

Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes

A.V. Kochetov , V.K. Shumny

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Transgenic plants are widely used for the investigation of functions of particular genes as well as for reconstruction of complex gene networks controlling plant morphology, biochemistry, and physiology during different development stages and in response to various external stimuli. Gene engineering instruments for the design of transgenic plants with either elevated or suppressed expression of target genes are discussed. Genetic constructs for protein synthesis or antisense RNA / self-complementary double-stranded RNA transcription are described. Transgenic plants with elevated or decreased levels of expression of S-like ribonucleases and decreased expression of the proline dehydrogenase gene are considered as examples. It was believed that S-like RNase functions concern mainly phosphate remobilization from senescent organs. However, expression patterns of some genes coding for S-like RNases were similar to some pathogen-responsive genes (both local and systemic induction after wounding or pathogen inoculation). In addition, some pathogenesis-related proteins (PR-4 family) possess RNase activity and can inhibit growth of pathogenic fungi. Investigation of transgenic plants revealed that high ribonuclease activity in apoplast correlated with increased resistance against tobacco mosaic virus. Thus, S-like RNases may have a new function as a part of the plant basal antiviral defense mechanism. Another set of transgenic plants bears an antisense suppressor of the proline dehydrogenase gene (PDH) constructed with an Arabidopsis target gene segment. Tobacco, maize and sunflower plants with this heterologous suppressor were characterized with a moderate decrease in PDH activity and a mild (1.5–3-fold) increase in the proline content under normal conditions. It was also found that these plants were more tolerant to various abiotic stresses (drought, NaCl, cold, toxic heavy metals), which may result from the protective proline effect early in exposure to stress, preventing the cellular gene expression machinery from damage by stress-generated free radicals.

Key words: plants; genetic engineering; pathogen resistance; stress tolerance; proline; ribonucleases.

Первые линии трансгенных растений были получены более тридцати лет назад (Bevan et al., 1983; Murai et al., 1983) с помощью векторной системы, основанной на *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton, 1983). За минувшие три десятилетия технологии получения трансгенных растений стали общепринятым способом исследования функций отдельных генов и их систем, а также проложили путь для получения сортов с новыми ценными свойствами для нужд сельского хозяйства и биотехнологических производств (Kamthan et al., 2016; Nogué et al., 2016). Использование трансгенных форм для проведения исследований можно косвенно оценить по количеству научных публикаций, в названии или аннотации которых наряду с названием растения присутствуют термины *transgene* или *transgenic*. Этот подход широко применялся для работ не только с классическими «модельными» растениями (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*), но и с важнейшими сельскохозяйственными культурами:

Вид растения	Кол-во статей*
Любое растение (термин plant)	26 222
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7 983
<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)	6 443
<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	1 450
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	1 016

* Аннотированы в системе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), август 2016 г.

Классическая схема получения трансгенных растений приведена на рис. 1. Планирование создания трансгенных растений включает разработку схемы генетической конструкции, структура которой обусловлена видом растений и способом трансформации. Эффективность трансформации зависит не только от вида растений, но и от генотипа и может в значительной степени варьировать у разных сортов (Altpeter et al., 2016). Для трансформации двудольных растений обычно используют разоруженные штаммы *Agrobacterium tumefaciens*, однако агробактериальная трансформация многих видов однодольных растений затруднена, и в этом случае применяют другие методы, например бомбардировку частицами с сорбированной на них ДНК генетической конструкции с последующим отбором каллусов на селективных фонах и регенерацией трансгенных растений. Для агробактериальной трансформации используют бинарные векторы, способные реплицироваться и в *Escherichia coli*, и в агробактерии. *A. tumefaciens* переносит в геном растений сегмент ДНК (Т-область), расположенный между концевыми повторами (LB, RB) (Bourras et al., 2015; Peyret, Lomonosoff, 2015). В структуре Т-области генетической конструкции можно выделить два ключевых элемента (см. рис. 1): репортерный ген для отбора трансформантов на селективных средах и собственно целевой генетический элемент для экспрессии в клетках растения, ради которого и проводится эксперимент по получению и анализу трансгенных форм. В качестве такого целевого элемента могут использоваться белок-кодирующие гены, гены микроРНК, сегменты генов-мишеней для синтеза антисмысловых или самокомплементарных (двухцепочечных) РНК. Важное значение имеют служебные элементы (промотор, поли(А)-

сигнал, трансляционные энхансеры), а также адаптация структуры чужеродной ДНК для правильной экспрессии в клетках растений (сайты инициации и терминации трансляции, вторичная структура в 5'-нетранслируемом районе, в некоторых случаях – оптимизация кодонного состава для максимизации уровня экспрессии) (Egelkrout et al., 2012; Smirnova et al., 2012; Кочетов и др., 2014; Герасимова и др., 2016).

Важнейший этап планирования генетической конструкции – выбор промотора. На ранних этапах развития генной инженерии применялся ограниченный круг промоторов вирусного или агробактериального происхождения (35S, рNOS, рMAS), а также промоторы высокоэкспрессирующихся генов (актина, убиквитина, тубулина). Однако для решения поставленных в эксперименте задач может потребоваться экспрессия трансгена, ограниченная определенной тканью, периодом развития или внешними условиями (индуцибельные промоторы). Накопление информации о транскриптомах и паттернах экспрессии генов растений (в том числе трансгенов под управлением различных промоторных районов в трансгенных растениях) значительно расширило возможности по дизайну генетических конструкций (Smirnova et al., 2012). В ИЦиГ СО РАН был получен ряд линий трансгенных растений для изучения функций отдельных генов и механизмов генетического контроля фенотипических характеристик, некоторые из которых описаны ниже.

Линии трансгенных растений с измененным уровнем активности апопластных рибонуклеаз

В геноме растений содержатся гены экстраклеточных рибонуклеаз (РНКаЗ), функции которых традиционно связывали с ремобилизацией фосфатов из отмирающих частей растений (S-подобные РНКаЗы), а также с устойчивостью к фитопатогенным грибам (некоторые белки семейства PR-4) (Филипенко и др., 2013; Jashni et al., 2015; Stigter, Plaxton, 2015). Было выдвинуто предположение о возможной роли РНКаЗ апопласта в устойчивости к вирусам (подавляющее большинство вирусов растений содержат РНК-геномы, которые могут разрушаться рибонуклеазами). Для проверки этого предположения были созданы линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие гены панкреатической РНКазы *Bos taurus*, S-подобной РНКазы *Zinnia elegans*, а также линии табака с супрессированным геном собственной S-подобной РНКазы *Nk1* (Сангаев и др., 2007, 2010; Trifonova et al., 2007, 2012).

На рис. 2 приведены схемы двух генетических конструкций: для синтеза экстраклеточной РНКазы растительного происхождения использована кДНК гена *ZRNaseII* циннии, помещенная под управление сильного конститутивного промотора 35S РНК ВМЦК (см. рис. 2, а); для супрессии гена S-подобной РНКазы табака *Nk1* использованы сегменты этого гена, расположенные в виде инвертированного повтора (см. рис. 2, б). Видно, что экспрессия генетических конструкций изменяет спектр активных рибонуклеаз в белковых экстрактах растений в сравнении с исходными (нетрансгенными)

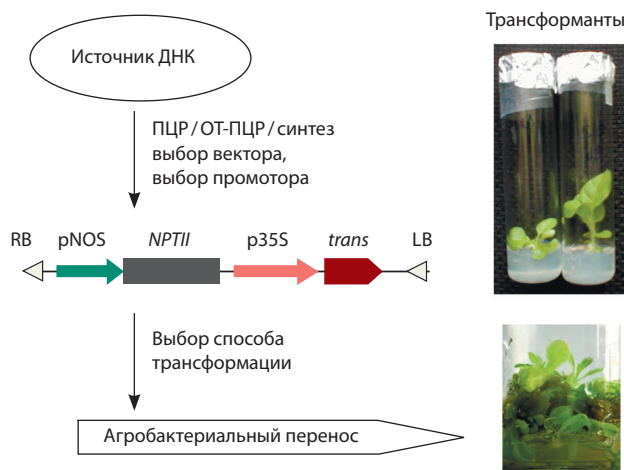
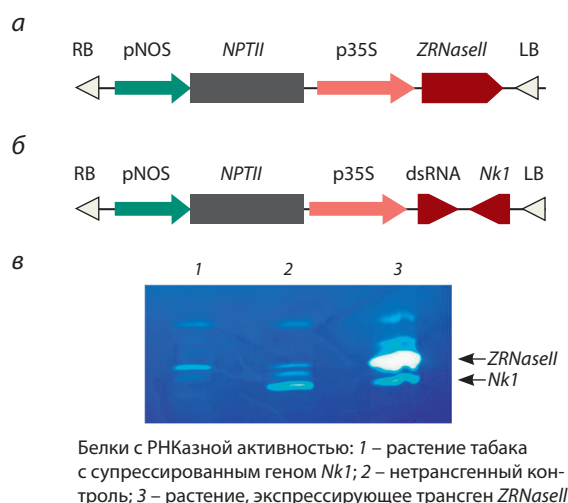


Рис. 1. Классическая схема получения трансгенных растений.

ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскрипция; синтез – синтетические сегменты ДНК; RB, LB – концевые повторы, окаймляющие T-область в бинарном векторе; *NPTII* – ген неомизинтрансферазы II *E. coli*, один из вариантов репортерного гена, обеспечивающий отбор трансгенных растений на селективных средах; pNOS – промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S – промотор гена 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; *trans* – трансген или антисмысловый сегмент/инвертированный повтор для супрессии гена-мишени с помощью РНК-интерференции. Агробактериальный перенос осуществляется с помощью «разоруженных» штаммов *A. tumefaciens*, T-области Ti-плазмиды которых делетированы, и в геном клетки растения переносится T-область из бинарного вектора. В качестве примера приведены фотографии канамицин-устойчивых трансформантов *Nicotiana tabacum*.

формами в заданном направлении (см. рис. 2, в). При этом трансгенные растения и исходный сорт табака не имели видимых различий (см. рис. 2, з).

Для экспрессии гетерологичного гена (секреторной РНКазы млекопитающих) использовался другой вариант генетической конструкции, в котором кДНК панкреатической РНКазы *Bos taurus* была помещена под управление промотора 2' гена маннопинсинтазы. В отличие от сильного конститутивного промотора 35S ВМЦК, этот промотор характеризовался более низким уровнем экспрессии в норме, а также высоким уровнем локальной индукции в районе повреждения тканей растений (Trifonova et al., 2007). Поскольку вирусы часто попадают в растения с помощью переносчиков-фитофагов, паттерн транскрипции промотора 2' был близок к природным вариантам генов защитных белков. Обе конструкции обеспечивали высокий уровень рибонуклеазной активности в апопласте (в 8–15 раз выше, чем у контроля), при этом линии трансгенных растений характеризовались существенной задержкой развития вируса табачной мозаики (Trifonova et al., 2007, 2012), а также вируса мозаики огурца, принадлежащих к разным таксономическим группам (Sugawara et al., in press). Гипотетические механизмы противовирусного действия экстраклеточных РНКаз могут быть основаны как на уязвимости геномной РНК вирусов на некоторых этапах их проникновения в растительную клетку, так и на имитации механизма программируемой клеточной смерти: при нарушении целостности тканей содержимое апопласта может проникнуть в цитоплазму



Белки с РНКазной активностью: 1 – растение табака с супрессированным геном *Nk1*; 2 – нетрансгенный контроль; 3 – растение, экспрессирующее трансген *ZRNaseII*



Рис. 2. Трансгенные растения с измененным уровнем экспрессии экстраклеточных рибонуклеаз.

а, б – схемы генетической конструкции: а – для экспрессии кДНК гена S-подобной РНКазы *Zinnia elegans* (*ZRNaseII*); б – дцРНК-супрессора гена S-подобной РНКазы *Nicotiana tabacum* *Nk1*; в – фореграмма белков с РНКазной активностью (в матрице геля содержится РНК, использован специальный краситель) (Сангаев и др., 2010); з – трансгенные (RNS) и нетрансгенные (SR1) растения *N. tabacum*.

поврежденных клеток, в этом случае активные РНКазы выполняют функции «киллерных» белков, убивающих клетку и предотвращающих репликацию геномной РНК проникшего в нее вируса.

Таким образом, результаты анализа вирусоустойчивости трансгенных растений с модифицированным уровнем РНКазной активности в апопласте позволили сделать заключение, что эти белки могут формировать «нуклеазный» барьер для РНК-вирусов и рассматриваться как элементы неспецифической системы защиты, сходные по паттерну экспрессии и некоторым функциям с PR-белками (pathogenesis-related proteins) (Trifonova et al., 2007). Помимо информации общенаучного характера, на основе полученных данных можно разработать новые способы получения сортов сельскохозяйственных растений с повышенным уровнем неспецифической устойчивости к вирусам. Для этого возможно использовать трансгены экстраклеточных РНКаз, а также генотипы с высокой РНКазной активностью в апопласте, отобранные после анализа их генетической изменчивости по указанному признаку (Sindarovska et al., 2014). В настоящее время уве-

личение уровня базовой (неспецифической) устойчивости к фитопатогенам в комбинации с направленным увеличением специфической устойчивости рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений селекции (Lee et al., 2016).

Линии трансгенных растений со сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы

В клетках многих видов растений пролин выполняет функции совместимого осмолита, и изменения в его содержании важны для быстрой адаптации растений к изменению в режиме водоснабжения. Кроме этого, согласно некоторым данным, пролин способен инактивировать свободные радикалы и защищать белки и мембраны растительных клеток от повреждений (Hayat et al., 2012). Считалось, что пролин может синтезироваться из глутамата, скорость-лимитирующим ферментом его синтеза служит пирролин-5-карбоксилатсинтаза (П5КС). Функции гена П5КС у разных видов растений активно исследовались, в том числе на модели трансгенных растений (Verdoy et al., 2006; Vendruscolo et al., 2007; и др.). Однако функции генов катаболизма пролина, в частности скорость-лимитирующего гена пролиндегидрогеназы (ПДГ), изучены в значительно меньшей степени.

Для определения вклада гена ПДГ в контроль стрессоустойчивости растений были разработаны трансгенные формы табака со сниженным уровнем его экспрессии (рис. 3). В составе генетической конструкции был использован короткий антисмысловой сегмент гена ПДГ арабидопсиса (см. рис. 3, а), что привело к частичной супрессии гена ПДГ, снижению активности фермента в два раза и к умеренному повышению активности пролина в норме (см. рис. 3, б). Анализ морфофизиологических характеристик растений показал, что трансгенные формы не имели видимых отличий от исходного сорта *Nicotiana tabacum* SR1, однако характеризовались увеличенным уровнем устойчивости к засухе, холоду, токсичным солям тяжелых металлов (см. рис. 3, в). В целом частичная супрессия гена ПДГ приводила к заметному сдвигу нормы реакции по признакам устойчивости к разным абиотическим стрессам (Кочетов и др., 2004; Колодяжная и др., 2007; Ибрагимова и др., 2012). Трансгенные формы растений подсолнечника и кукурузы, полученные с помощью этой же генетической конструкции, также отличались повышенной выживаемостью в условиях дефицита воды и засоления, что говорит о консервативной роли гена ПДГ в контроле стрессоустойчивости (Moiseeva et al., 2014; Tishchenko et al., 2014).

По-видимому, полученные результаты можно объяснить свойством пролина защищать молекулы белков от повреждений. При резком изменении условий окружающей среды (водоснабжение, повышение или понижение температуры и т. п.) у растений индуцируется экспрессия генов стрессового ответа, запускающих комплекс адаптационных процессов. В случае интенсивного стрессового воздействия без периода акклиматизации белки клеточного аппарата экспрессии могут быть повреждены, и своевременный синтез защитных белков не будет

запущен. Трансгенные формы со сниженным уровнем активности ПДГ характеризуются умеренно повышенным содержанием пролина в норме, что дает определенные преимущества на самых ранних этапах стрессового воздействия, в частности обеспечивает защиту факторов аппарата транскрипции и трансляции и синтез защитных белков, с помощью которых происходит дальнейшая адаптация клеток растений на биохимическом и физиологическом уровнях. Трансгенные растения оказались более устойчивыми к солям тяжелых металлов, токсическое действие которых во многом связано с повреждением молекул белков (см. рис. 3, в), что может рассматриваться как подтверждение этой гипотезы. В последние годы происходит переосмысление роли метаболической цепи синтеза пролина в процессах, протекающих в растении, и появляется большое количество новых данных о роли этой аминокислоты в формировании гаметофита (Biancucci et al., 2015), контроле старения растений (Zhang, Becker, 2015), защите от фитопатогенов (Qamar et al., 2015) и других ключевых процессах. Разработанные нами линии трансгенных растений также могут быть востребованы в качестве генетических моделей для исследования в указанных направлениях.

Важное значение имеет структура генетической конструкции, в которой в качестве антисмыслового супрессора был использован короткий сегмент кДНК гена арабидопсиса. Гетерологичный антисмысловый супрессор не приводил к полному выключению гена ПДГ в растениях *N. tabacum* (и, возможно, кукурузы), поэтому морфологические характеристики и сроки развития трансгенных форм в норме не имели значимых различий с исходным сортом, по крайней мере в условиях теплицы и в экспериментах *in vitro*. Выявленные закономерности можно использовать для получения новых сортов сельскохозяйственных растений с повышенной неспецифической устойчивостью к абиотическим стрессам, для чего могут применяться как методы трансгенеза, так и анализ имеющейся в популяциях генетической изменчивости по активности гена ПДГ/содержанию пролина в норме с последующим вовлечением отобранных генотипов в селекционный процесс с помощью методов маркер-ориентированной селекции (Spoljarević et al., 2011).

Другие методы генной инженерии для изучения генетического контроля признаков растений

В последние годы арсенал генно-инженерных технологий существенно расширился. К числу наиболее интересных технологий относится вирус-индуцируемый генетический сайленсинг (virus-induced gene silencing – VIGS), основанный на включении сегмента гена растения-хозяина в состав вирусного генома для индукции РНК-интерференции и выключения экспрессии гена-мишени на посттранскрипционном уровне (Жирнов и др., 2015; Lacome, 2015). Эффект от применения VIGS сходен с эффектом, наблюдаемым у трансгенных растений, несущих генетические конструкции с антисмысловыми или дцРНК-супрессорами (см. рис. 2, б и 3, а). Однако получение трансгенных форм для некоторых видов растений

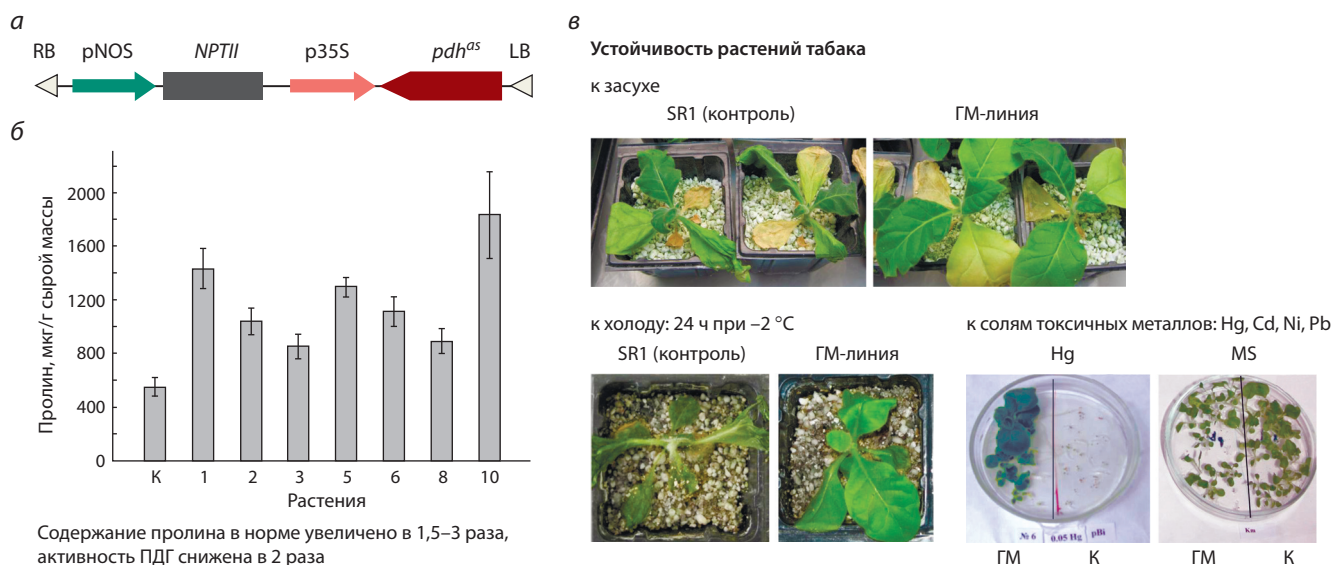


Рис. 3. Трансгенные растения со сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы.

а – схема генетической конструкции для частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы растений (*pdh^{as}* – антисмысловой сегмент гена *A. thaliana*); *б* – содержание пролина в листьях трансформантов; *в* – устойчивость трансформантов (GM-линии растений) по отношению к засухе, холоду, а также солям тяжелых металлов (Кочетов и др., 2004; Колодяжная и др., 2006, 2007; Ибрагимова и др., 2012).

представляет собой сложную процедуру. Кроме того, супрессия некоторых генов может блокировать развитие растений, поэтому получение таких трансгенных форм невозможно. VIGS позволяет выключить экспрессию гена-мишени в большинстве клеток взрослого (нетрансгенного) растения, что предоставляет дополнительные возможности в эксперименте. Технически для индукции VIGS используют агробактериальную трансфекцию (внешение суспензии *A. tumefaciens* в ткань листа). В составе T-области генетической конструкции под управлением растительного промотора расположена кДНК растительного вируса (как правило, нетрансмиссивный вариант, инфицирующий большинство тканей экспериментального растения, но не способный передаваться другому растению обычным для данного вируса способом). В состав этой кДНК включают сегмент гена-мишени, что приводит к индукции РНК-интерференции. Одним из наиболее часто и широко используемых вариантов является векторная система, основанная на вирусе погромковости табака (Жирнов и др., 2015; Lacomme, 2015).

В качестве примеров применения VIGS можно привести недавние работы по изучению транскрипционных факторов, контролирующих устойчивость к засухе (Wang et al., 2016) и фузариозу (Kumar et al., 2016): анализ последствий «выключения» экспрессии гена в клетках взрослого растения используется как часть комплексного процесса исследования, направленного на всестороннее выявление функций целевых генов.

Другой очень интересный генно-инженерный подход – это гетерологичный генетический сайленсинг (host-induced gene silencing – HIGS). Этот подход основан на индукции в растении РНК-интерференции с помощью трансгеноза или VIGS, но используются антисмысловые

сегменты не собственных генов растения, а генов взаимодействующих с растением организмов, например патогенных грибов или фитофагов (Koch, Kogel, 2014). Оказалось, что siRNA способны проникать в клетки фитофага и запускать эволюционно-консервативный механизм РНК-интерференции. Примером применения этой технологии служат работы по направленной HIGS-опосредованной супрессии важных генов *Puccinia triticina* (Panwar et al., 2013), *Fusarium oxysporum* (Koch et al., 2013), нематод (Dubreuil et al., 2009), насекомых (Kumar et al., 2012).

По-видимому, в ближайшем будущем будут разработаны новые технологии генной инженерии растений для непосредственного воздействия на фитофагов или другие организмы, взаимодействующие с растениями. Недавно был предложен подход, основанный на синтезе в трансгенных растениях автономных репликонов вирусной природы, не способных реплицироваться в клетках растений, но способных инфицировать клетки фитофагов (alien replicon producing organisms – ARPO), что может предоставить новые возможности в области биоконтроля природных популяций различных организмов (Kochetov, 2014).

Заключение

Методы и подходы генной инженерии необходимы для проведения фундаментальных исследований в области генетики растений. Трансгенные формы дают уникальные возможности для выявления функций отдельных генов, межгенных взаимодействий и в конечном итоге – для реконструкции сложных ансамблей генов, контролирующих формирование морфологических, биохимических и физиологических характеристик растений и механизмы адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды.

Благодарности

Исследования поддержаны бюджетным финансированием по государственному заданию (проект 0324-2015-0005) и грантом РФФИ (14-04-01036).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Герасимова С.В., Смирнова О.Г., Кочетов А.В., Шумный В.К. Наработка рекомбинантных белков в клетках растений. Физиология растений. 2016;63(1):31-43.
- Жирнов И.В., Трифонова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Вирусиндуцируемый сайленсинг как метод изучения функций генов высших растений. Генетика. 2015;51:558-567.
- Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Роль гена пролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости у растений. Физиология растений. 2012;59:99-107.
- Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Комарова М.Л., Романова А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Генетика. 2006;42:278-281.
- Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Трифонова Е.А., Романова А.В., Комарова М.Л., Коваль В.С., Шумный В.К. Трансформанты табака, экспрессирующие антисмысловую последовательность гена пролиндегидрогеназы, проявляют устойчивость к тяжелым металлам. Генетика. 2007;43:994-998.
- Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Генетика. 2004;40:282-285.
- Кочетов А.В., Филипенко Е.А., Смирнова О.Г., Шумный В.К. Энкапсулы трансляции для геной инженерии растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4):610-617.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В. Инактивация гена *Nkl* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 за счет РНК-интерференции. Генетика. 2010;46:131-134.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* SR1, экспрессирующие экстраклеточную рибонуклеазу *Zinnia elegans*. Генетика. 2007;43:1002-1005.
- Филипенко Е.А., Кочетов А.В., Kanaayama Y., Малиновский В.И., Шумный В.К. PR-белки с рибонуклеазной активностью и устойчивость растений к патогенным грибам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17:326-334.
- Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Jr. Advancing crop transformation in the era of genome editing. Plant Cell. 2016;28(7):1510-1520.
- Bevan M.W., Flavell R.B., Chilton M.D. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature. 1983;304:184-187.
- Biancucci M., Mattioli R., Forlani G., Funck D., Costantino P., Trovato M. Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. Front. Plant Sci. 2015;4(6):680.
- Bourras S., Rouxel T., Meyer M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. Phytopathology. 2015;105(10):1288-1301.
- Chilton M.D. A vector for introducing new genes into plants. Sci. Am. 1983;248:36-45.
- Dubreuil G., Magliano M., Dubrana M.P., Lozano J., Lecomte P., Favery B., Abad P., Rosso M.N. Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. J. Exp. Bot. 2009;60:4041-4050.
- Egelkrot E., Rajan V., Howard J.A. Overproduction of recombinant proteins in plants. Plant Sci. 2012;184:83-101.
- Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review. Plant Signal Behav. 2012;7(11):1456-1466.
- Jashni M.K., Mehrabi R., Collemare J., Mesarich C.H., de Wit P.J. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. Front. Plant Sci. 2015;6:584.
- Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement. Theor. Appl. Genet. 2016;129(9):1639-1655.
- Koch A., Kogel K.H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. Plant Biotechnol. J. 2014;12(7):821-831.
- Koch A., Kumar N., Weber L., Keller H., Imani J., Kogel K.H. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to Fusarium species. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013;110(48):19324-19329.
- Kochetov A.V. The alien replicon: artificial genetic constructs to direct the synthesis of transmissible self-replicating RNAs. BioEssays. 2014;36:1204-1212.
- Kumar A., Yogendra K.N., Karre S., Kushalappa A.C., Dion Y., Choo T.M. WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist Fusarium head blight in barley spikelets. J. Exp. Bot. 2016;67(14):4127-4139.
- Kumar P., Pandit S.S., Baldwin I.T. Tobacco rattle virus vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. PLoS One. 2012;7:e31347.
- Lacomme C. Strategies for altering plant traits using virus-induced gene silencing technologies. Methods Mol. Biol. 2015;1287:25-41.
- Lee S., Whitaker V.M., Hutton S.F. Mini review: Potential applications of non-host resistance for crop improvement. Front. Plant Sci. 2016;11(7):997.
- Moiseeva Y.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. Agrobacterium-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method. British Biotechnol. J. 2014;4(2):116-125.
- Murai N., Kemp J.D., Sutton D.W., Murray M.G., Slightom J.L., Merlo D.J., Reichert N.A., Sengupta-Gopalan C., Stock C.A., Barker R.F., Kemp J.D., Hall T.C. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. Science. 1983;222:476-482.
- Nogué F., Mara K., Collonnier C., Casacuberta J.M. Genome engineering and plant breeding: impact on trait discovery and development. Plant Cell Rep. 2016;35(7):1475-1486.
- Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. Plant Mol. Biol. 2013;8:595-608.
- Peyret H., Lomonossoff G.P. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. Plant Biotechnol. J. 2015;13(8):1121-1135.
- Qamar A., Mysore K.S., Senthil-Kumar M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. Front. Plant Sci. 2015;6(6):503.
- Sindarovska Y.R., Guzyk O.I., Yuzvenko L.V., Demchenko O.A., Didenko L.F., Grynevych O.I., Spivak M.Y. Ribonuclease activity of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) cultivars with different sensitivities to buckwheat burn virus. Ukr. Biochem. J. 2014;86(3):33-40.
- Smirnova O.G., Ibragimova S.S., Kochetov A.V. Simple database to select promoters for plant transgenesis. Transgenic Res. 2012;21:429-437.

- Spoljarević M., Agić D., Lisjak M., Gumze A., Wilson I.D., Hancock J.T., Teklić T. The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. *Plant Signal Behav.* 2011; 6(2):251-257.
- Stigter K.A., Plaxton W.C. Molecular mechanisms of phosphorus metabolism and transport during leaf senescence. *Plants (Basel)*. 2015; 4(4):773-798.
- Tishchenko O.M., Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V. Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro and in planta using Lba4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytol. Genetics*. 2014;48:218-226.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L., Scherban A.B., Shumny V.K., Polyakova A.M., Lapshina L.A., Kochetov A.V., Malinovsky V.I. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Reports*. 2007;26:1121-1126.
- Trifonova E.A., Romanova A.V., Sangaev S.S., Sapotsky M.V., Malinovsky V.I., Kochetov A.V. Inducible expression of the gene of *Zimmia elegans* coding for extracellular ribonuclease in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants. *Biologia Plantarum*. 2012;56:571-574.
- Vendruscolo E.C., Schuster I., Pileggi M., Scapim C.A., Molinari H.B., Marur C.J., Vieira L.G. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.* 2007; 164(10):1367-1376.
- Verdoy D., Coba De La Peña T., Redondo F.J., Lucas M.M., Pueyo J.J. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 2006;29(10):1913-1923.
- Wang C., Lu W., He X., Wang F., Zhou Y., Guo X., Guo X. The cotton mitogen-activated protein kinase kinase 3 functions in drought tolerance by regulating stomatal responses and root growth. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(8):1629-1642.
- Zhang L., Becker D.F. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Front. Plant Sci.* 2015;22(6):552.

Теоретические аспекты гетерозиса

Л.В. Хотылева, А.В. Кильчевский, М.Н. Шаптуренко 

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Явление гетерозиса, известное как превосходство гибридов F_1 над родителями, эффективно используется в сельскохозяйственной практике с начала прошлого века, однако его генетические причины остаются нераскрытыми. На основе экспериментальных данных, полученных при исследовании гибридов кукурузы, и теоретических расчетов были предложены базовые модели, описывающие этот феномен с точки зрения различных типов взаимодействия генов – доминирования, сверхдоминирования и эпистаза. Каждая из предложенных концепций имеет недостатки, накладывающие определенные ограничения на возможность полной интерпретации механизмов формирования гетеротического ответа в F_1 . В данном обзоре дана критическая оценка теоретических концепций гетерозиса с позиции накопленных к настоящему времени данных генетики и молекулярной биологии, которые концентрируются на конкретных механизмах, действующих в отношении специфических признаков. В частности, показана роль летальных и полуметальных мутаций при формировании гетеротического фенотипа у растений. Рассмотрены вопросы интерпретации генетических эффектов при наличии сцепления, которые относят к псевдосверхдоминированию. Особое внимание уделено неаллельным взаимодействиям генов, которые добавляют новые нюансы при обсуждении эффектов доминирования и сверхдоминирования. Представлена информация о понятии комбинационной способности и ее практическом использовании в контексте концепции гетеротических групп. Показаны некоторые аспекты взаимодействия генотип – среда. Выполненный анализ теоретических концепций гетерозиса с позиции современных данных генетики свидетельствует о важной роли различных типов действия генов при формировании выдающегося фенотипа и подтверждает необходимость системного подхода к этому сложному и уникальному явлению.

Ключевые слова: гетерозис; взаимодействие генов; доминирование; сверхдоминирование; эпистаз.

Theoretical aspects of heterosis

L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky, M.N. Shapturenko 

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

The phenomenon of heterosis, known as superior performance of hybrid organism compared with either of their parents, has been exploited by agricultural practices in the production of various crops since the beginning of the last century; however, its genetic basis has remained obscure. With experimental data obtained from the study of maize hybrids, and mathematical calculations, some genetic models have been proposed to explain heterosis from various types of gene interaction, such as dominance, over-dominance and epistasis. However, any of the proposed concepts has weak points, which place limitations on the possibility of overall interpretation of heterotic response in F_1 . In this review we gather a brief account of findings from various studies for critical evaluation of the main theoretical concepts based on the information accumulated to date by genetics and molecular biology and focused on particular mechanisms acting for specific traits. We discussed some aspects concerning the role of mutation loads in the formation of heterotic phenotype. Also, we gathered a brief account of findings for interpretation of genetic effects due to linkage and non-allelic genes' interactions that make nuances to analysis of dominance and over-dominance. We have provided information about combining ability, its practical application in the context of the concept of heterotic groups. Here we also discussed some aspects of "genotype – environment" interaction. Recent advancements in genetics and molecular biology indicate the importance of various types of gene action for heterosis and confirm the necessity of system-level approaches to understanding this unique phenomenon.

Key words: heterosis; genes interactions; dominance; over-dominance; epistasis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хотылева Л.В., Кильчевский А.В., Шаптуренко М.Н. Теоретические аспекты гетерозиса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):482-492. DOI 10.18699/VJ16.174

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V., Shapturenko M.N. Theoretical aspects of heterosis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):482-492. DOI 10.18699/VJ16.174

Гетерозис является одним из наиболее значимых феноменов биологии. Его коммерческое использование позволило значимо увеличить валовые сборы продукции как в растениеводстве, так и животноводстве (Duvick, 2001; Fu et al., 2014). Первые публикации по этой проблеме (Shull, 1908, 1914), вышедшие более 100 лет назад, заложили основу современной гибридной селекции не только у кукурузы, но и у других хозяйственно ценных культур. Столь высокая значимость гетерозиса послужила импульсом к изучению генетических механизмов этого уникального явления и развитию теоретических моделей (Shull, 1908, 1952; Bruce, 1910; East, Hayes, 1912; Jones, 1917; Charlesworth, Willis, 2009).

Впервые использование гетерозиса в сельскохозяйственной практике было осуществлено на кукурузе (*Zea mays*), затем на свекле (*Beta vulgaris*), сорго (*Sorghum bicolor*), луке (*Allium cepa*), баклажанах (*Solanum melongena*), томатах (*Lycopersicon esculentum*), перце (*Capsicum*), рисе (*Oryza sativa*), хлопке (*Gossypium hirsutum*), подсолнечнике (*Helianthus annuus*) и рапсе (*Brassica napus*) (Melchinger, Gumber, 1998). Началом гибридной селекции считают 1920 г. (Crow, 1998). В 1924 г. были проданы первые несколько бушелей гибридных семян кукурузы (Crabb, 1947) и в ее производстве начался стремительный переход от свободноопыляющихся сортов к гибридам. В штате Айова доля гибридов в производственных посевах выросла от менее чем 10 % в 1935 г. до более 90 % в последующие четыре года. К 1950 г. большинство высеваемых на территории США семян кукурузы были гибридными (Crow, 1998). За счет использования в сельскохозяйственной практике гибридов этой культуры удалось увеличить сборы зерна на 15 % по сравнению с лучшим свободноопыляющимся сортом. К концу XX в. посевы F_1 кукурузы составляли уже около 65 % от общей площади ее возделывания, что обеспечило четырехкратный прирост ее годового производства (Duvick, 1999). Широко возделываемый в странах Азии гибридный рис дал преимущество в 20–30 % по сравнению с наилучшими инбредными сортами, способствуя увеличению эффективности производства на 44 % (Cheng et al., 2007). В Китае, как одном из крупнейших мировых производителей рапса, его гибриды занимают не менее 75 % от общих посевных площадей (Fu, 2009). У такой важной зерновой культуры мира, как пшеница (*Triticum aestivum*), гибриды обеспечивают превосходство в 10–25 % (Hoisington et al., 1999). Несмотря на трудности производства гибридных семян *T. aestivum*, в 2012 г. посевы F_1 пшеницы в Европе достигли 250 тыс. га, с преимущественной долей Франции – основного монополиста в области производства химических агентов «стерилизации» (<http://www.hybridwheat.net>). Для сорго почти половина мировых посевов представлена гибридами с экономическим эффектом 35–40 % (Duvick, 1999). Прогресс использования гетерозиса на практике стимулировал интерес ученых-генетиков в исследовании этого уникального феномена и способствовал появлению теоретических концепций, которые претерпевали различные модификации и интерпретации с развитием методов анализа и получением новых данных. В своем классическом варианте они определили направления исследований на многие годы.

Генетические модели гетерозиса

Основные представления о механизмах двух функционально противоположно направленных явлений (инбридинг и гетерозис) сводятся к одно- и многолокусной моделям (рис. 1). Однолокусная модель предполагает (1) доминирование, при котором действие вредных рецессивов подавлено доминантным гомологом (Davenport, 1908; Jones, 1917), и (2) сверхдоминирование, которое также обусловлено взаимодействием между членами одной и той же пары аллелей (Shull, 1908; East, Hayes, 1912). Генетическое объяснение гетерозиса и инбридинговой депрессии в случае однолокусной модели связано с доминантными уровнями аллелей. В первом случае предполагается преимущество гетерозигот, во втором – действие частично или полностью рецессивных мутантных аллелей, приводящее к уменьшению жизнеспособности гомозигот. Многолокусная модель рассматривает гетерозис с позиции неаллельных взаимодействий генов или эпистаза.

В контексте теории доминирования (Davenport, 1908; Bruce, 1910; Keeble, Pellew, 1910; Jones, 1917; Collins, 1921) превосходство гибридов F_1 обусловлено аккумуляцией у гибрида благоприятных доминантных генов и доминантной комплементацией вредных рецессивов. Очевидно, имеет место взаимодействие аллельных факторов. Значение доминирования для объяснения дегенерации при инбридинге и благоприятного эффекта при скрещивании впервые было отмечено С.В. Davenport (1908), предполагавшим влияние на признак небольшого числа факторов с хорошо выраженным индивидуальным действием.

Могут ли мутации объяснить наблюдаемую степень депрессии при инбридинге и ее снятие при аутбридинге? Безусловно, вредные мутации присутствуют в естественных популяциях и насыщенность полулеталями и летальными ни в коей мере не умаляет их важной роли в поддержании высокого уровня биологической приспособленности. Есть все основания считать, что неблагоприятные и даже летальные в гомозиготе рецессивы являются необходимыми частями генотипов хорошо приспособленной популяции и активно поддерживаются отбором на соответствующей частоте.

Исследования *Drosophila melanogaster* показали, что около 30 % второй и третьей хромосом дикого типа, изолированных у мужской особи, летальны в гомозиготе (Crow, 1993). Гетерозиготы по летальным хромосомам практически всегда жизнеспособны, что подтверждает рецессивный характер этих мутаций. Различные дикие летальные хромосомы несут разные летальные мутации. Если отбор направлен на преимущество гетерозигот, частоты аллелей, понижающих жизнеспособность гомозигот, должны быть промежуточными (средними) и распределяться между различными генотипами. Эксперименты по анализу мутаций у *D. melanogaster* показали, что частоты летальных мутаций поддерживаются на низком уровне, а гомозиготность снижает приспособленность мух в течение жизненного цикла в среднем до 84 % (Sved, 1971; Latter et al., 1998).

Для большинства видов растений и животных не установлено, в какой степени инбридинговая депрессия связана с летальными мутациями, так как гомозиготные эмбрионы погибают на самых ранних стадиях своего раз-

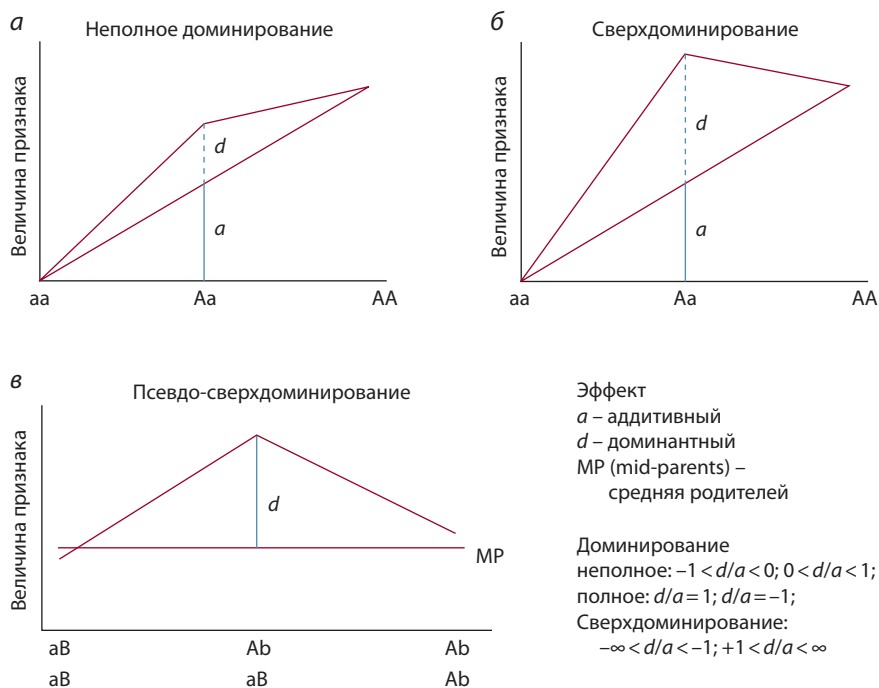


Рис. 1. Генетические модели гетерозиса: доминирование (а) и сверхдоминирование (б), соответствующие однолокусной модели; псевдосверхдоминирование (в), возникающее при тесном сцеплении между двумя локусами с противоположными аддитивными эффектами, согласно (Goff, Zhang, 2013).

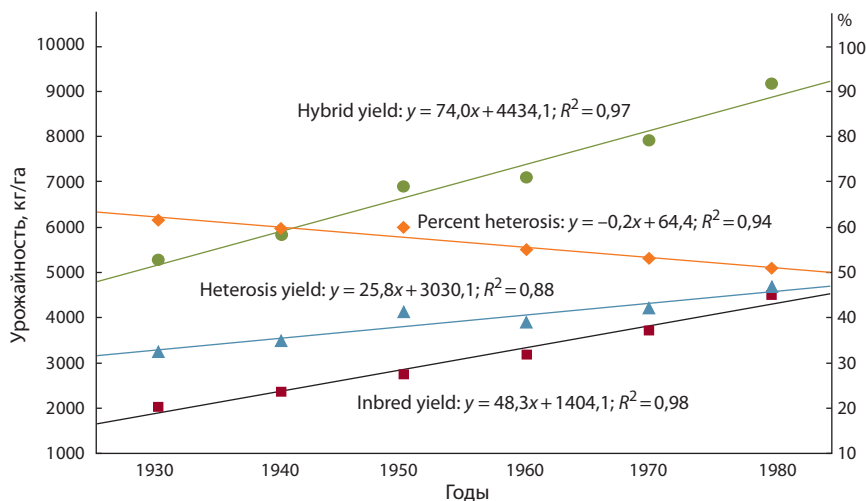


Рис. 2. Урожайность простых гибридов (hybrid yield, ●), средняя их инбредных родителей (inbred yield, ■), относительный гетерозис (%), percent heterosis, ◆) и абсолютный гетерозис (heterosis yield, ▲) кукурузы, возделываемой в США в течение 1916–1985 гг. (Duvick, 1999; Troyer, Wellin, 2009).

вития. Однако в отдельных исследованиях показаны сходные с *D. melanogaster* частоты летальных мутаций в популяциях мангровых деревьев, травянистого растения *Mimulus guttatus*, а также некоторых видов рыб (Ohnishi, 1982, 1985; McCune et al., 2002).

С точки зрения популяционной генетики перекрестноопыляющиеся популяции в отношении частоты рецессивных мутаций стремятся к достижению равновесия, при котором число неблагоприятных рецессивов, добавляемых мутационным процессом, точно уравнивается числом таких же рецессивов, элиминируемых отбором. Если неблагоприятная мутация полностью

рецессивна, то отбор действует только на гомозиготу; чем выше частота рецессивных аллелей в популяции, тем выше вероятность появления рецессивных гомозигот и тем больше таких гомозигот подвергается элиминации. Появление рецессивных гомозигот снижает среднюю жизнеспособность популяции. Зная скорость мутирования и общее число локусов, способных к мутированию, можно для конкретного вида свободноопыляющейся популяции определить максимальную величину теоретически возможного гетерозисного эффекта, вызываемого действием данной причины. Соответствующее вычисление J.F. Stow (1952) для кукурузы показало, что такой эффект у межлинейных гибридов составляет не более 5 %, в то время как в действительности лучшие межлинейные гибриды превосходят по урожайности свободноопыляющиеся сорта на 30 % и более. Концептуально, величина гетерозиса должна уменьшиться в процессе аккумуляции у линий «сильных» аллелей и «очищения» от вредных рецессивов, а сами линии должны достичь уровня продуктивности лучших гибридов (Duvick, 2001). Ретроспективный анализ селекционного улучшения кукурузы показал отсутствие значимого снижения уровня гетерозиса F₁ в результате «очищения» инбредных линий в процессе селекции, которое должно было бы присутствовать, если теория верна. Между тем урожайность гибридов увеличивалась пропорционально урожайности новых улучшенных инбредных линий (рис. 2) (Duvick, 1999, 2001; Troyer, Wellin, 2009), т.е. устранение вредных рецессивов посредством инбридинга не изменило относительного преимущества гибридов F₁. J.A. Bercler и его коллеги (2003) предположили, что константное увеличение урожайности F₁ и значимый гетерозисный эффект на протяжении многих лет обусловлены селекцией аллелей в «правильном» наборе локусов, которые создают лучшие сочетания при гибридизации. Ранее E.T. Bingham (1998) сделал схожее заключение, объясняя наблюдаемую тенденцию аккумуляцией благоприятных генов в хромосомных блоках и их ассоциированными взаимодей-

ствиями (кумулятивный эффект), указав на решающее значение наличия неравновесия по сцеплению (*linkage disequilibrium*). Теоретически можно допустить возможность получения мощных гомозиготных линий, но на практике этому препятствует сцепление благоприятных доминантных аллелей с неблагоприятными рецессивами. Еще G.N. Collins (1921) отметил, что при значительном числе факторов, влияющих на мощность гибридов, возможность получения организма, гомозиготного по всем благоприятным доминантным аллелям, ничтожно мала ($1 : 4^n$, где n – число пар факторов, контролирующих признак). Наиболее успешно идет «очищение» от мутаций со значительными эффектами. Следовательно, как гетерозис, так и инбридинговая депрессия могут быть обусловлены кумулятивным действием многих индивидуальных, редких, частично вредных мутаций, которые не являются основной мишенью отбора и могут быть элиминированы лишь через сотни, а то и тысячи поколений (Charlesworth et al., 1990; Wang et al., 1999).

Частые случаи сцепления благоприятных доминантных факторов с вредными и даже летальными в гомозиготе рецессивами свидетельствуют о важном значении этих рецессивов для генотипа в целом. Избирательное удаление мажорных и минорных мутаций посредством инбридинга в течение нескольких поколений, последующее скрещивание и анализ аутбредных форм могли бы прояснить вклад мутаций. Подобный эксперимент по «очищению» у растения *Mimulus guttatus* лишь немного снизил инбридинговую депрессию (Willis, 1999), тогда как в популяции насекомого *Stator limbatus* вклад мутаций со значительными эффектами был высоким и снижение инбридинговой депрессии достигало 35–73 % (Fox et al., 2008). Эти результаты подтверждают выводы D. Charlesworth и J. Willis (2009), которые считают, что «очищение» в процессе отбора не может полностью исключить роль мутаций, так как улучшенные характеристики инбредных линий могут быть обусловлены отбором аллелей в локусах, не связанных с гетерозисом, и последний может быть обязан многочисленным мутациям с малыми эффектами, которые не были удалены в процессе селекции улучшенной линии.

Еще один аргумент против доминантной модели – прогрессивный гетерозис у полиплоидов, который также сложно объяснить с позиции концепции доминирования (Bingham et al., 1994). В этом случае величина гетерозиса максимизируется числом геномов полиплоида, указывая, что эффект дозы может играть более важную роль, чем простая комплементация либо взаимодействие аллелей (Birchler, Veitia, 2010).

Третий аспект, касающийся полиплоидов и выступающий против роли мутационного груза в регуляции эффекта гетерозиса, – это высокая сопоставимость скорости инбридинговой депрессии на ди- и тетраплоидном уровнях, хотя теоретически потеря мощности на более высоком уровне плоидности должна происходить медленнее (Busbice, Wilsie, 1966; Rice, Dudley, 1974; Birchler et al., 2003).

Несмотря на спорные вопросы, связанные с ролью мутаций в проявлении гетерозиса, теорию доминирования рассматривают и под другим углом зрения: с позиции аддитивного действия наследственных факторов. При этом

изменяется и само содержание понятия доминирования, когда оно применимо к случаю взаимодействия не индивидуальных пар аллелей, а двух родительских наборов множественных факторов, влияющих на развитие того или иного признака у гибридов. Следовательно, наибольшая мощность должна проявляться в тех случаях, когда у гибрида больше локусов с доминантными благоприятными аллелями. Область возможного эффекта, достигаемого при подавлении действия вредных рецессивов доминантными аналогами, несколько ограничивается.

В настоящее время концепция доминирования занимает лидирующее положение. Такие факты, как отсутствие снижения уровня гетерозиса (Duvick, 2001), прогрессивный гетерозис у полиплоидов и быстрая скорость инбридинговой депрессии на тетраплоидном уровне, свидетельствуют об ограниченных возможностях этой модели (Birchler et al., 2003; Springer, Stupar, 2007). Тем не менее ее широкое распространение объясняется важным значением, которое эта теория придает аддитивным эффектам и неаллельному взаимодействию генов.

В конце 1940-х гг. возрос интерес к идее гетерозиготности как основного механизма гетерозиса благодаря исследованиям F. Hull (1952), который ввел понятие сверхдоминирования, вместо предложенного ранее R.A. Fisher (1931) для этой ситуации супердоминирования. Согласно теории сверхдоминирования, взаимодействие двух членов одной и той же пары аллелей может приводить к преимуществу гетерозиготы *A1A2* над обеими гомозиготами *A1A1* и *A2A2*. В данном случае предполагают, что оба аллеля в гетерозиготе выполняют несколько различные функции и при этом взаимно дополняют друг друга. Поэтому в серии множественных аллелей эффект сверхдоминирования могут проявлять лишь пары аллелей, отличающиеся друг от друга. Таким образом, речь идет о комплементарном эффекте при взаимодействии между аллелями в пределах одного локуса. Эта гипотеза представляет собой развитие высказанных G.H. Shull (1952) и E.M. East с H.K. Hayes (1912) взглядов о стимулирующем действии гетерозиготности, которые очень близки по смыслу к заключениям Ч. Дарвина о причинах биологически полезного эффекта скрещивания.

Важным доводом в пользу теории сверхдоминирования стал гетерозис двойных межлинейных гибридов кукурузы, которые получают путем комбинации четырех неродственных линий. Если гетерозис простых межлинейных гибридов, являющихся родительскими формами двойного гибрида, можно объяснить подавлением действия вредных рецессивов доминантными аллелями, то при скрещивании простых гибридов в результате расщепления и рекомбинации должно образоваться большее число гомо- или гетерозиготных вредных рецессивов, а следовательно, они должны быть по мощности роста всегда хуже простых гибридов. В действительности двойные межлинейные гибриды кукурузы не уступают лучшим простым, что согласуется с теорией сверхдоминирования.

В популяции сверхдоминантных аллели поддерживаны отбором на промежуточных частотах, даже если одна или обе гомозиготы имеют низкую жизнеспособность. Иногда сохраняется хромосомный инверсионный полиморфизм (Hoffmann, Rieseberg, 2008; Kirkpatrick, 2010)

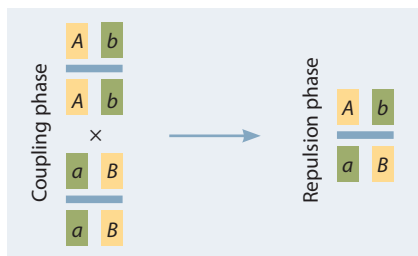


Рис. 3. Сцепленные рецессивные полулетели (*a*, *b*) в фазе сопряжения (coupling) и отталкивания (repulsion) у родительских форм и гибрида, согласно (Charlesworth, Willis, 2009).

и полиморфизм больших геномных областей с супрессированными рекомбинациями (Dyer et al., 2007). В последних могут накапливаться различные мутации, снижающие жизнеспособность в гомозиготном состоянии (сверхдоминантные области) (Glemin et al., 2001). Помимо этого, могут поддерживаться аллели с антагонистической плейотропией, например оказывающие негативный эффект на приспособленность и позитивный – на другие признаки и стадии онтогенеза при определенных условиях среды (Charlesworth, Hughes, 1996).

Несмотря на то что случаи сверхдоминирования подтверждены экспериментально, зависимость гибридной мощности от степени гетерозиготности оспаривают многие авторы. Основное противоречие заключается в том, что эта модель подразумевает взаимодействия в одном или небольшом числе локусов, в то время как большинство агрономических признаков полигенно (Беляев и др., 1968; Lippman, Zamir, 2007; Springer, Stupar, 2007). J.A. Birchler и R.A. Veitia (2010) предположили, что в случае моногенного гетерозиса имеет место эффект действия на регуляторные сети, которые не рассматриваются концепцией полигенного контроля. Если изменения в регуляторных сетях связаны с проявлением гетерозиса, то вариация в отдельных или нескольких генах, по которым имеются различия среди родительских форм (сортов, линий), также будет влиять на формирование гетеротического ответа в F_1 .

Еще один контраргумент исходит из факта существования сцепления

между генами, которое подтверждено большинством современных исследований. Тем не менее представлены доказательства, которые поддерживают споры вокруг важности сверхдоминантного действия аллелей. Некоторые работы демонстрируют однолокусные взаимодействия при проявлении гетерозиса по различным признакам у ряда культур (Gustafson, 1946; Redei, 1962; Шумный и др., 1982; Dollinger, 1985; Semel et al., 2006; Krieger et al., 2010). D. Schwartz и W.J. Laughner (1969) изучали активность фермента алкогольдегидрогеназы I (*adg1*), который является гетеродимером. Аллель фермента с высокой активностью был скомбинирован с аллелем, обуславливающим толерантность к высоким температурам. Дальнейшие наблюдения показали, что гетероаллельная форма фермента превосходит по активности гомоаллельную форму в специфических стрессовых условиях. Показана повышенная экспрессия гена *P1* кукурузы у гетерозигот, содержащих одну копию эпигенетически модифицированного аллеля *P1*, что выражается в повышении пигментации за счет увеличения уровня антоцианов (Hollick, Chandler, 1998). В одном из недавних исследований также описана моногенная модель сверхдоминирования у томата (Krieger et al., 2010). Гетерозиготность по аллелю SFT (single flower trust) с мутантной копией, контролирующей синтез гормона флоригена, приводит к увеличению урожая более чем на 60 %, подтверждая ведущую роль сверхдоминирования. Наблюдаемая реакция связана со сдвигом программы развития гетерозиготного по SFT генотипа в сторону увеличения числа цветущих соцветий в сравнении с гомозиготами дикого типа, для которых характерен более мощный вегетативный рост, но при этом они образуют мало соцветий. В отличие от случая с *adh1*, сверхдоминантный эффект SFT обусловлен эффектом дозы на молекулярную экспрессию, которая приводит к балансу генного продукта в сверхдоминантном генотипе. Этот пример также подчеркивает потенциальные возможности тонкой настройки программы развития организма. В другом исследовании, выполненном на линиях культурного томата с интрогрессиями *Solanum pennellii*, отмечено, что гетерозис F_1 по большинству репродуктивных признаков, т.е. связанных с урожаем и семенной продуктивностью, обусловлен сверхдоминированием, тогда как для вегетативных признаков преимущество имеют доминирование и эпистаз (Semel et al., 2006). Один из ярких примеров моногенного гетерозиса продемонстрирован для *tenera*-гибрида (*dura* × *pisifera*) масличной пальмы, превышение урожайности которого достигает 30 % в производственных посевах (Singh et al., 2013; Ong-Abdullah et al., 2015). Высокая продуктивность *tenera*- F_1 обеспечена эффектом сверхдоминирования *SHELL*-гена, участвующего в формировании плода, одна копия которого представлена диким типом, а вторая – нормальная «высокопродуктивная». Именно такое гетерозиготное сочетание аллелей ($Aa > AA$) обеспечивает высокий выход масла из семян.

При оценке эффекта сверхдоминирования имеется одна существенная проблема, о которой упоминалось выше, – невозможность отделить сверхдоминирование от доминирования. Это ситуация, которая соответствует многолокусной модели взаимодействий при гетерозисе, – псевдосверхдоминирование, связанное с неравновесием по сцеплению (*linkage disequilibrium*; *repulsion phase linkage*), также называемым смещенной связью (*linkage bias*) (Bingham, 1998). В этом случае в F_1 происходит комплементация между тесно сцепленными доминантными аллелями и различными вредными рецессивами в фазе отталкивания (рис. 3) (Crow, 1952; Stuber et al., 1992; Graham et al., 1997). Сцепленные локусы будут имитировать однолокусное взаимодействие, не позволяя, таким образом, разделить истинные эффекты. Гетерозис, связанный с псевдосверхдоминированием, не будет проявляться в самоопыленном потомстве (F_2), потому что генетическая рекомбинация приведет к диссоциации аллелей, находившихся изначально в фазе отталкивания, что и было подтверждено Y. Semel с коллегами (2006). Псевдосверхдоминирование также может возникнуть за счет рекомбинационно супрессированных областей, где «хорошие» и «плохие» комбинации аллелей находятся в фазе отталкивания (Gore et al., 2009; McMullen et al., 2009).

Третья модель объясняет гетерозис с позиции неаллельных взаимодействий, или эпистаза, который добавляет новые нюансы в обсуждение роли домини-

нирования и сверхдоминирования (Sprague et al., 1962; Phillips, 2008). Именно учет этого типа взаимодействий позволяет не только хорошо объяснять многие факты, относящиеся к вопросам гетерозиса, но и предложить некоторые конкретные приемы использования гибридной мощности в сельскохозяйственной практике. Различают эпистаз генетический (физиологический), когда действие одного локуса обусловлено другим локусом и наблюдается маскирующий эффект, и эпистаз статистический, который описывает отклонение, имеющее место, когда комбинированный аддитивный эффект двух или более генов не объясняет наблюдаемый фенотип. В то время как физиологический эпистаз не зависит от частот генов популяции и является отличительной чертой генотипа, статистический эпистаз характеризует популяцию и зависит от частот генов.

Классически эпистаз определяется как взаимодействие между генами в двух или более локусах, влияющих на фенотипическое выражение признака. Такое взаимодействие может наблюдаться между локусами с различными эффектами, включая доминирование, сверхдоминирование и аддитивность. Исходя из этого выделяют три основные формы эпистатического взаимодействия генов: аддитивно-аддитивный, аддитивно-доминантный и доминантно-доминантный эпистаз. С. J. Goodnight (1999) провел анализ роли эпистаза в проявлении гетерозиса и показал, что при аддитивно-доминантном и доминантно-доминантном эпистазе изменяется проявление гетерозиса в отдельном локусе, т.е. внутрилокусный гетерозис – функция генетического фона. Следовательно, генетический фон и взаимодействия в нем могут влиять на эффекты отдельных локусов, в том числе при формировании гетеротического ответа. Поэтому эпистаз представляет серьезное препятствие для картирования и изучения комплексных признаков, фенотипические эффекты которых маскируются неаллельными взаимодействиями.

В некоторых работах (Wolf, Hallauer, 1997; Kusterer et al., 2007) доказано наличие эпистаза для ряда признаков в отдельных гетеротических комбинациях. Наши исследования, направленные на изучение связи гетерозиса с неаллельными взаимодействиями генов, позволили установить, что хотя и существует корреляция между этими двумя феноменами, но гетерозис может быть и при отсутствии неаллельного взаимодействия. Это убедительно подтверждают результаты анализов компонентов гетерозиса по ряду количественных признаков у гибридов кукурузы (Khotyleva, Tarutina, 1997). Установлено, что в тех случаях, когда положительный гетерозис проявлялся в присутствии неаллельного взаимодействия, то оно было дубликатного типа. Комплементарный тип эпистаза не встречался ни у одного из проанализированных гибридов. Подобные закономерности встречаются крайне редко. Если в литературе и отмечается связь между высоким и положительным гетерозисом и неаллельным взаимодействием, то, как правило, это взаимодействие бывает комплементарного типа, что и нашло подтверждение при изучении диаллельных гибридов F_1 тепличного томата и перца сладкого (Тарутина и др., 1996; Tarutina et al., 1999; Хотылева и др., 2005). В генетическом контроле признаков, определяющих урожай плодов, присутствовал эпи-

стаз комплементарного типа, обусловленный одной или несколькими родительскими формами. Однако уровень гетерозиса, наблюдаемого у разных гибридов с участием этих форм, не всегда находится в прямой зависимости от эпистаза.

Последние исследования с использованием молекулярных маркеров и современных статистических подходов увеличили возможности выявления эпистатических взаимодействий. Доказательства роли эпистаза в формировании гетеротического ответа F_1 представили D.P. Wolf и A.R. Hallauer (1997), выполнив тройной тесткросс на кукурузе. Исследователи обнаружили в потомстве гетеротического гибрида $B73 \times Mo17$ эпистатические взаимодействия для нескольких признаков, включая урожай, его основные компоненты и сроки развития. Аналогичные данные получены для арабидопсиса (Kusterer et al., 2007; Melchinger et al., 2007a) и риса (Li et al., 2001; Hua et al., 2003). На важную роль неаллельных взаимодействий для экспрессии количественных признаков указывают А.Е. Melchinger и его коллеги (2007b). На основе анализа QTL с выраженными эффектами были разработаны теоретические модели анализа эпистатических взаимодействий (Melchinger et al., 2007b; Reif et al., 2009). При изучении роли эпистаза в проявлении гетерозиса у арабидопсиса были получены результаты, обосновывающие классическую генетическую теорию, которая описывает гетерозис как сумму индивидуальных QTL эффектов. Разработаны подходы, позволяющие оценивать эпистатические взаимодействия отдельных QTL с целым генетическим фоном (QTL-by-background interactions). Таким образом, расширена концепция эпистаза от дигенного до системного уровня взаимодействий. Если рассматривать арабидопсис как модельный объект для автогамных видов, то релевантность эпистатических взаимодействий QTL с соответствующим генетическим фоном свидетельствует о трудностях маркер-ассоциированного отбора (marker assisted selection – MAS), так как генетическая ценность интрогрессированных областей будет зависеть от совокупности факторов генетического фона реципиента. Для установленных дигенных аддитивно-аддитивных взаимодействий с эффектом, превышающим 75 % MAS, отбор может успешно осуществляться лишь при условии комплементарного переноса сегментов, проявляющих дигенный эпистаз (Reif et al., 2009).

Все проведенные исследования по выяснению роли эпистаза в детерминации хозяйственно ценных количественных признаков подтверждают положения классической генетики о том, что он выступает одним из факторов, определяющих гетерозис в некоторых специфических комбинациях скрещивания, и свидетельствуют о том, что неаллельные взаимодействия генов служат источником смещения упрощенных теоретических моделей.

При изучении эффектов действия и взаимодействия генов по ряду количественных признаков было показано, что гетерозис, как правило, не проявляет прямой зависимости от величины и характера генного действия. Например, более высокие оценки доминирования, равно как и присутствие неаллельного взаимодействия, не всегда сопровождаются более высоким гетерозисом. Вероятно, все три типа: аддитивность, доминирование, эпистаз –

действуют совместно при формировании гетеротического ответа в F_1 . Таким образом, гетерозис не может быть объяснен влиянием какой-либо одной генетической причины, каким-либо одним типом взаимодействия генов. Это суммарный эффект часто фенотипически сходного действия разнородных генетических процессов, и, по-видимому, в основе разных форм проявления гетерозиса лежат разные генетические причины. Эту концепцию, объясняющую всю сложность генетической детерминации гетерозиса, высказал К. Mather (1955), а затем развил Н.В. Турбин (1961), исходя из предположения (Mather, 1942, 1943), что нормальное развитие признака есть результат определенного равновесия между противоположно направленными действиями различных наследственных факторов на данный признак. Удаление, изменение или замена некоторых из них неизбежно будут давать преимущество факторам, обладающим противоположным действием, и в некоторых случаях это должно вести к изменению величины тех или иных признаков у организмов со «смещенным» генетическим балансом. В последнее время появились работы, подтверждающие на молекулярном уровне сбалансированность действия различных генетических факторов при формировании превосходного фенотипа (Birchler, Veitia, 2010; Birchler et al., 2016).

Некоторые физиолого-биохимические и молекулярные аспекты гетерозиса

Исследования, проводимые в разные годы, подтвердили, что все три типа генного действия (аддитивность, доминирование, эпистаз) совместно управляют конечным выражением гетерозисного эффекта и гетерозис не может быть объяснен с позиции кокой-либо отдельной теретической концепции. Гетерозис следует рассматривать как суммарный эффект фенотипически сходного действия разнородных генетических процессов, и, по-видимому, в основе разных форм проявления гетерозиса лежат разные генетические причины (Турбин, 1961; Тарутина и др., 1996; Хотылева и др., 2005). Вместе с тем его рассмотрение с точки зрения гипотезы генетического баланса не исключает возможности изучения роли отдельных видов взаимодействия наследственных факторов как причины гетерозиса с помощью упрощенных теоретических моделей.

По мере изучения явления гетерозиса накапливалась информация о механизмах его проявления на различных уровнях: молекулярном, биохимическом, физиологическом, клеточном, организменном. На Первой международной конференции по гетерозису в 1952 г. в Мексике А. J. Mangelsdorf (1952) выдвинул для объяснения физиологических причин гетерозиса концепцию лимитирующих факторов, или физиологических «узких мест» (bottleneck – горлышко бутылки). R. H. Nageman с коллегами (1967) предложили концепцию метаболического баланса для объяснения эффекта гетерозиса, которая очень близка взглядам А. J. Mangelsdorf (1952). Согласно этой концепции, признаки развиваются как результат биохимических реакций, каждая из которых управляется одним или более специфическими ферментами. Эффект гетерозиса проявляется в координации всех реакций и систем для

эффективного роста в среде. Концепция комплементации биохимических систем связывает воедино гипотезы доминирования и сверхдоминирования, поскольку она основана на взаимодействии множественных аллелей и межгенной комплементации, в результате чего биохимические процессы усиливаются.

Белорусскими генетиками (Хотылева и др., 1991) предложен биоэнергетический подход к анализу гетерозиса. В.В. Титок (2002) сформулировал основные положения биоэнергетической концепции, согласно которой гетерозис обусловлен биоэнергетическим балансом, возникающим в гетерозиготном состоянии при снятии генетического блокирования за счет компенсаторного действия геномов родительских форм, несущих сегрегированные локусы «узких мест» энергетического метаболизма. Показано, что преимущество гибридов F_1 обусловлено высокой сбалансированностью активности функционирования основных энергообразующих систем: фотофосфорилирования, окислительного фосфорилирования, гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот – и ростовых процессов в ходе онтогенеза. Рядом авторов отмечено, что гетерозисные гибриды отличаются от исходных форм митотической активностью (Essad, Maunory, 1979), активностью фотосинтеза (Loomis et al., 1971), активностью митохондрий и пластид (Srivastava, 1974), содержанием эндогенных регуляторов роста (Пашкаръ, 1974).

Новые перспективы в исследовании эффекта гетерозиса раскрывают современные методы молекулярной генетики, которые позволяют изучать вариабельность отдельных участков ДНК и исследовать структурную и неструктурную зоны генома. Изменчивость на этом уровне во много раз выше, чем ее фенотипическое проявление. В последние годы проведены обширные исследования, направленные на поиск маркеров, сцепленных с гетерозисом (Wang et al., 2014; Feng et al., 2015). На различных культурах с использованием разных типов ДНК-маркеров получены многообещающие результаты (Springer, Stupar, 2007; Shapturnenko et al., 2014, 2015).

Понятие комбинационной способности

Вся совокупность исследований, осуществленных более чем за вековую историю изучения феномена гетерозиса, свидетельствует о важной роли различных типов действия генов, что дает ключ к пониманию особенностей проявления гетерозиса у гибридов, обладающих разной степенью гетерозиготности. При благоприятном сочетании компонентов скрещивания наблюдается максимальное приращение показателей признаков в F_1 по сравнению с родительскими формами. В настоящее время оценка комбинационной способности стала необходимым элементом селекции на гетерозис, особенно на начальном этапе, когда чрезвычайно важен отбор исходного материала не только по значению хозяйственно ценных признаков самих линий, но и по их комбинационной ценности.

G. F. Sprague и L. A. Tatum (1942) выделили понятие общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности, определив ОКС как среднюю ценность родительской формы в гибридных комбинациях с ее участием, а СКС как характеристику отдельных гибридных комбинаций, когда они оказываются хуже или лучше, чем

предполагалось на основании только ОКС изучаемых родительских форм (Турбин, 1961; Турбин и др., 1974; Хотылева, Тарутина, 2008).

D. Matzinger и O. Kempthorne (1956) на основании теоретических исследований вывели соотношение между общей и специфической комбинационной способностью и аддитивными, доминантными и эпистатическими эффектами генов, описав его математически. Следуя их расчетам, можно сделать заключение, что ОКС зависит от аддитивного эффекта генов в той части эпистатического эффекта, который обусловлен взаимодействием генов с аддитивным эффектом, а СКС зависит от доминантного и эпистатического действия генов. Статистический аппарат для оценки эффектов и вариантов ОКС и СКС разработан и детально изложен австралийским генетиком В. Griffing (Griffing, 1956; Griffing, Langridge, 1963).

Для получения необходимых данных о комбинационной способности проводят скрещивания с последующим испытанием гибридного потомства. Общую КС можно оценить при различных системах скрещивания (свободное опыление, поли- и топкросс, диаллельные скрещивания). Специфическую КС оценивают только в диаллельных скрещиваниях и топкроссах, причем в последнем случае существуют ограничения, налагаемые на тестеры: это должны быть либо инбредные линии, либо простые гибриды с точно известной генетической конституцией. От подхода к выбору тестера в значительной степени зависит точность оценки как общей, так и специфической комбинационной способности. Однако наиболее полную информацию о КС можно получить лишь в системе диаллельных скрещиваний (Griffing, 1956; Турбин и др., 1966). В этом случае предоставляется возможность определить относительную ценность анализируемых форм и указать пути использования той или иной формы в конкретных комбинациях скрещивания. Различные модели, применяемые при диаллельном анализе, подробно описаны Н.В. Турбиным с сотрудниками (1974), Л.В. Хотылевой и Л.А. Тарутиной (2008).

Для максимального использования эффекта сверхдоминирования в селекции на гетерозис удобно применять метод оценки комбинационной способности по А.В. Кильчевскому (1982), который основан на принципе реципрокности и обеспечивает отбор сверхдоминантных локусов. Предложенная схема для селекции на гетерозис превосходит классическую схему топкроссов с последующими диаллельными скрещиваниями при отборе по генам, проявляющим эффект сверхдоминирования, и не уступает ей при отборе по аддитивным и доминантным генам.

Прямое использование данных о комбинационной способности демонстрирует концепция гетеротических групп (Melchinger, Gumber, 1998; Akinwale et al., 2014). Каждая из них фиксирует различные аллели, которые при комбинировании с аллелями другой гетеротической группы позволяют получить потенциально высокий эффект гетерозиса в F_1 за счет позитивной комплементации аллелей, обусловливающей высокое выражение признака у гибрида (Schon et al., 2010). Проведение реципрокных скрещиваний между этими группами позволит установить оптимальное сочетание родительских форм (Melchinger, Gumber, 1998).

Получение и поддержание различных гетеротических пулов ведет к дифференциации исходного материала (линий), не связанного по происхождению; к увеличению аллельного разнообразия среди гетеротических пулов; к повышению степени гетерозиготности в F_1 и потенциального уровня гетерозиса; к снижению специфической комбинационной способности и, соответственно, соотношения СКС к вариансе ОКС и в конечном итоге к стабильной и результативной селекционной работе, нацеленной на использование гетерозиса (Melchinger, 1987; Melchinger, Gumber, 1998; Reif et al., 2005).

Взаимодействия «генотип – среда»

Поскольку гетерозис проявляется в конкретных условиях среды, важно учитывать взаимодействия «генотип – среда». В различных условиях среды тип наследования в конкретной гибридной комбинации может изменяться в широких пределах. Разработаны подходы генетического анализа, которые базируются на испытании генотипов в различных средах и позволяют выявить общую и специфическую адаптивную способность генотипов, их стабильность, селекционную ценность и вести отбор по адаптивной способности в зависимости от поставленной селекционной задачи. Наряду с оценкой общей и специфической адаптивной способности, такие подходы позволяют получить информацию о средах как фонах для отбора (Жученко, 1980; Кильчевский, Хотылева, 1985; Кильчевский, 1986). При этом общая адаптивная способность (ОАС) генотипа характеризует среднее значение признака в различных условиях среды, специфическая (САС) – отклонение от ОАС в определенной среде. Предлагаемая методика основана на объединении линейной и нелинейной части реакции генотипа на среду и этим отличается от метода K.W. Finlay и G.N. Wilkinson (1963), где мерой стабильности является линейная реакция; метода G. Wricke (1962), где стабильность оценивают по нелинейной реакции, и методов S.A. Eberhart и W.A. Russell (1966), G.C. Tai (1971), где введены соответствующие параметры линейной и нелинейной реакции генотипа.

Наряду с упомянутыми выше работами, большой вклад в развитие исследований по гетерозису, инициированных Н.В. Турбиным, внесли ученые Института генетики и цитологии НАН Беларуси, которым принадлежат не только разработки генетики свойства комбинационной способности (Турбин и др., 1974; Генетические основы..., 2008), методических проблем селекции на гетерозис и взаимодействия «генотип – среда» (Кильчевский, Хотылева, 1985; Тарутина, Хотылева, 1990), но и подходы к использованию периодического отбора (Каминская, 1985), изучение генетики цитоплазматической мужской стерильности и ее использования при получении гибридных семян (Турбин, Палилова, 1975), изучение генетики полиплоидных растений в связи с использованием гетерозиса на уровне три- и тетраплоидных гибридов у сахарной свеклы (Бормотов, Турбин, 1971; Генетические основы..., 2008, 2014).

Данные многочисленных исследований, осуществленных более чем за вековую историю изучения гетерозиса, свидетельствуют, что это сложное и интригующее явление – результат работы всей совокупности разнообразия генов, путей взаимодействия и процессов, действующих

на разных системных уровнях и стадиях развития живого организма. Отдельные исследования, как правило, концентрируются на конкретных механизмах в контексте специфических признаков и оперируют в пределах ограниченной вариации событий и поэтому недостаточны для системной интерпретации механизмов этого сложного и уникального феномена. Существующие концептуальные подходы биологами: геномика, транскриптомика, метаболомика и др. – способны облегчить выявление ключевых механизмов и элементов регуляции гетерозиса и прояснить перспективы их направленного использования в сельскохозяйственной практике.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» 2011–2015 гг. и МЦП ЕврАзЭС (2011–2015 гг.).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Беляев Д.К., Евсиков В.И., Шумный В.К. Генетико-селекционные аспекты проблемы моногенного гетерозиса. *Генетика*. 1968; 12:47-52.

Бормотов В.Е., Турбин Н.В. Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свеклы. Минск, 1971.

Генетические основы селекции растений. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. Науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. Минск, 2014;4(4).

Генетические основы селекции растений. Общая генетика растений. Науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. Минск, 2008;4(1).

Дарвин Ч. Действие перекрестного опыления и самоопыления в растительном мире. Л., 1939.

Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений. Кишинев, 1980.

Каминская Л.Н. Рекуррентная селекция. Минск, 1985.

Кильчевский А.В. Комплексная оценка среды как фона для отбора в селекционном процессе. Доклады Академии наук БССР. 1986;30(9):846-849.

Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Метод оценки адаптивной способности и стабильности генотипов, дифференцирующей способности среды. Сообщение 1. Обоснование метода. *Генетика*. 1985;21(9):1481-1490.

Пашкар С.И. К биохимической диагностике гетерозиса, ЦМС и полиплоидии у кукурузы в процессе селекции: Физиология растений в помощь селекции. М., 1974;161-177.

Тарутина Л.А., Хотылева Л.В. Взаимодействие генов при гетерозисе. Минск, 1990.

Тарутина Л.А., Хотылева Л.В., Мишин Л.А., Посканная С.И., Капуста И.Б. Связь гетерозиса и неаллельного взаимодействия у гибридов первого поколения тепличных томатов. Доклады Академии наук Беларуси. 1996;40(6):72-75.

Титок В.В. Биоэнергетические основы формирования гетерозиса у сельскохозяйственных растений: Генетика и селекция в XXI веке: матер. VIII съезда БОГиС. Минск, 2002;163-165.

Турбин Н.В. Гетерозис. Теория и методы практического использования. Минск, 1961.

Турбин Н.В., Палилова А.Н. Генетические основы цитоплазматической мужской стерильности у растений. Минск, 1975.

Турбин Н.В., Тарутина Л.А., Хотылева Л.В. Сравнительная оценка методов анализа комбинационной способности у растений. *Генетика*. 1966;2(8):8-18.

Турбин Н.В., Хотылева Л.В., Тарутина Л.А. Диаллельный анализ в селекции растений. Минск, 1974.

Хотылева Л.В., Разумович А.Н., Титок В.В. Биоэнергетические процессы при гетерозисе. Минск, 1991.

Хотылева Л.В., Тарутина Л.А. Генетика гетерозиса: Генетические основы селекции растений. 2008;1:81-173.

Хотылева Л.В., Тарутина Л.А., Капуста И.Б., Мишин Л.А. Эпистаз и гетерозис у гибридов тепличного томата. *Агроэкология: сб. научн. тр. «Экологические основы плодовоовощеводства»*. Горки, 2005;2:143-146.

Шумный В.К., Соколов В.А., Вершинин А.В. Гетерозис и механизмы сверхдоминирования: Гетерозис. Минск, 1982;109-141.

Akinwale R.O., Badu-Apraku B., Fakorede M.A.B., Vroh-Bi I. Heterotic grouping of tropical early-maturing maize inbred lines based on combining ability in Striga-infested and Striga-free environments and the use of SSR markers for genotyping. *Field Crops Research*. 2014;156:48-62. DOI 10.1016/j.fcr.2013.10.015.

Bingham E.T. Role of chromosome blocks in heterosis and estimates of dominance and overdominance: Concept and breeding of heterosis in crop plant. *Crop Sci. Soc. Amer.* 1998;25:71-87. DOI 10.2135/cropsci1998.0011183X003400040001x.

Bingham E.T., Groose R.W., Woodfield D.R., Kidwell K.K. Complementary gene interactions in alfalfa are greater in autotetraploids than diploids. *Crop Sci.* 1994;34:823-829. DOI 10.2135/cropsci1994.0011183X003400040001x.

Birchler J.A., Auger D.L., Riddle N.C. In search of the molecular basis of heterosis: The Plant Cell. 2003;15(10):2236-2239. DOI http://dx.doi.org/10.1105/tpc.151030.

Birchler J.A., Johnson A.F., Veitia R.A. Kinetics genetics: Incorporating the concept of genomic balance into an understanding of quantitative traits. *Plant Science*. 2016;245:128-134. DOI 10.1016/j.plantsci.2016.02.002.

Birchler J.A., Veitia R.A. The gene balance hypothesis: Implications for gene regulation, quantitative traits and evolution. *New Phytol.* 2010;186(1):54-62. DOI 10.1111/J.1469-8137.2009.03087.X.

Bruce A.B. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science*. 1910;32:627-628. DOI 10.1126/science.32.827.627-a.

Busbice T.H., Wilsie C.P. Inbreeding depression and heterosis in autotetraploids with application to *Medicago sativa* L. *Euphytica*. 1966; 15:52-67. DOI 10.1007/BF00024079.

Charlesworth B., Hughes K. Age-specific inbreeding depression and components of genetic variance in relation to the evolution of senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996;93:6140-6145. DOI 10.1073/pnas.93.12.6140.

Charlesworth D., Morgan M.T., Charlesworth B. Inbreeding depression, genetic load and the evolution of outcrossing rates in a multi-locus system with no linkage. *Evolution*. 1990;44:1469-1489. DOI 10.2307/2409330.

Charlesworth D., Willis J. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10:783-796. DOI 10.1038/nrg2664.

Cheng S.H., Zhuang J.Y., Fan Y.Y., Du J.H., Cao L.Y. Progress in research and development on hybrid rice: a superdomesticated in China. *Ann. Bot.* 2007;100(5):959-966. DOI 10.1093/aob/mcm121.

Collins G.N. Dominance and vigor of first generation hybrids. *Am. Nat.* 1921;55(637):116-133.

Crabb A.R. The hybrid-corn markers: prophets of plenty. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, 1947.

Crow J.F. Dominance and overdominance. Ed. J.W. Gowen. Heterosis. Iowa State College Press, Ames, 1952;282-297.

Crow J.F. Mutation, mean fitness, and genetic load. *Oxf. Surv. Evol. Boil.* 1993;9:3-42.

Crow J.F. 90 years ago: The beginning of hybrid maize. *Genetics*. 1998;148:923-928. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539413.

Davenport C.B. Degeneration, albinism and inbreeding. *Science*. 1908;28:454-455. DOI 10.1126/science.28.718.454-b.

Dollinger E.J. Effects of visible recessive alleles on vigor characteristics in a maize hybrid. *Genetics*. 1985;25:819-821. DOI 10.2135/cropsci1985.0011183X002500050022x.

- Duvick D.N. Heterosis: feeding people and protecting natural resources. Eds J.G. Coors, S. Pandey. Proc. of the international symposium on the genetics and exploitation of heterosis in crops, CIMMYT, Mexico City, 17–22 Aug. 1999. ASA, CSSA, SSSA, Madison, 1999; 19-29.
- Duvick D.N. Biotechnology in the 1930s: the development of hybrid maize. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2:69-74. DOI 10.1038/35047587.
- Dyer K.A., Charlesworth B., Jaenike J. Chromosome-wide linkage disequilibrium as a consequence of meiotic drive. *PNAS.* 2007;104(5): 1587-1592. DOI 10.1073/pnas.0605578104.
- East E.M., Hayes H.K. Heterozygosity in evolution and in plant breeding. *U.S. Dept. Agric. Plant Industr. Bull.* 1912;243:58.
- Eberhart S.A., Russell W.A. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.* 1966;6(1):36-40. DOI 10.2135/cropsci1966.0011183X000600010011x.
- Essad S., Maunory C. Kinetic and instantaneous characteristics of mitosis related to heterosis and inbreeding in *Zea mays*. *J. Ann. Amelior. Plant.* 1979;29(6):689-698.
- Feng Sh., Chen X., Wu Sh., Chen X. Recent advances in understanding plant heterosis. *Agricultural Science.* 2015;6:1033-1038. DOI 10.4236/as.2015.69098.
- Finlay K.W., Wilkinson G.N. The analysis of adaptation in plant-breeding programme. *Austral. J. Agric. Res.* 1963;14(6):742-754.
- Fisher R.A. The evolution of dominance. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 1931;6:345-368.
- Fox C.W., Scheibly K.L., Reed D.H. Experimental evolution of the genetic load and its implications for the genetic basis of inbreeding depression. *Evolution.* 2008;62:2236-2249. DOI 10.1111/j.1558-5646.2008.00441.x.
- Fu D., Xiao M., Hayward A., Fu Y., Liu G., Jiang G., Zhang H. Utilization of crop heterosis: a review. *Euphytica.* 2014;197:161-173. DOI 10.1007/s10681-014-1103-1107.
- Fu T.D. Considerations on heterosis utilization in rapeseed (*Brassica napus*). 16th Australian research assembly on Brassicas. Ballarat, 2009.
- Glemin S., Bataillon Th., Ronfort J., Mignot A., Olivieri I. Inbreeding Depression in Small Populations of Self-Incompatible Plants. *Genetics.* 2001;159:1217-1229.
- Goodnight C.J. Epistasis and heterosis. Genetic and exploitation of heterosis in crop. Madison (Wisconsin, USA), 1999;59-68.
- Goff S., Zhang Q. Heterosis in elite hybrid rice: speculation on the genetic and biochemical mechanisms. *Current Opinion Plant Biology.* 2013;16:221-227. DOI 10.1016/j.pbi.2013.03.009.
- Gore M.A., Chia J.M., Elshire R.J., Sun Q., Ersoz E.S., Hurwitz B.L., Peiffer J.A., McMullen M.D., Grills G.S., Ross-Ibarra J., Ware D.H., Buckler E.S. A first-generation haplotype map of maize. *Science.* 2009;326:11-15. DOI 10.1126/science.1177837.
- Graham G.I., Wolff D.E., Stubber C.W. Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five of maize by fine mapping. *Crop Science.* 1997;37:1601-1610. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700050033x.
- Griffing B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian J. Biol. Sci.* 1956;9:463-493.
- Griffing B., Langridge I. Statistical genetics and plant breeding. Washington, 1963;982:368-394.
- Gustafson A. The effect of heterozygosity on viability and vigor. *Hereditas.* 1946;32:263-286.
- Hageman R.H., Leng E.R., Dudley J.W. Biochemical approach to corn breeding. *Advan. Agron.* 1967;19:45-86.
- Hoffmann A.A., Rieseberg L.H. Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? *Ann. Rev. Ecology, Evolution, Systematics.* 2008;39:21-42. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173532.
- Hoisington D., Khairallah M., Reeves T., Ribaut J.M., Skovmand B., Taba S., Warburton M. Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999;96(11):5937-5943.
- Hollick J.B., Chandler V.L. Epigenetic allelic states of a maize transcriptional regulatory locus exhibit overdominant gene action. *Genetics.* 1998;150:891-897. PMID: PMC1460365.
- Hua J., Xing Y., Wu W., Xu C., Sun X., Yu S., Zhang Q. Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003;100(5):2574-2579. DOI 10.1073/pnas.0437907100.
- Hull F.H. Recurrent selection for overdominance. Ed. L.W. Cowen. Heterosis. Iowa State College Press, Ames, 1952:451-474.
- Jones D.F. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics.* 1917;2:466-479. PMID: PMC1091241.
- Keeble F., Pellew C. The mode of inheritance of stature and of time of flowering in peas (*Pisum sativum*). *J. Genet.* 1910;1:47-56. DOI 10.1007/BF02981568.
- Khotyleva L.V., Tarutina L.A. Nonallelic interactions and heterosis in corn: Book of abstracts of International symposium “The genetics and exploitation of heterosis in crops”. Mexico, 1997:146-147.
- Kirkpatrick M. How and Why Chromosome Inversions Evolve. *Plos Biology.* 2010;8(9):e1000501. DOI 10.1371/journal.pbio.1000501.
- Krieger U., Lippman Z.B., Zamir D. The flowering gene single flower truss drives heterosis for yield in tomato. *Nature Genetics.* 2010;42:459-463. DOI 10.1038/ng.550.
- Kusterer B., Muminovic J., Utz H. Analysis of a triple testcross design with recombinant inbred lines reveals a significant role of epistasis in heterosis for biomass-related traits in *Arabidopsis*. *Genetics.* 2007;175(4):2009-2017. DOI 10.1534/GENETICS.106.069005.
- Latter B., Mulley J., Reid D., Pascoe L. Reduced genetic load revealed by slow inbreeding in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1998; 139:287-297.
- Li Z., Luo L., Mei H. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. II. Grain yield components. *Genetics.* 2001;158(4):1755-1771. PMID: PMC1461764.
- Lippman Z.B., Zamir D. Heterosis: revisiting the magic. *Trends Gen.* 2007;23:60-66. DOI 10.1016/j.tig.2006.12.006.
- Loomis R.S., Williams W.A., Hall A.E. Agricultural productivity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1971;22:431-468.
- Mangelsdorf A.J. Gene interaction in heterosis: Heterosis. Ames: Iowa State College Press, 1952:321-329.
- Mather K. The balance of polygenic combinations. *J. Genet.* 1942;43: 309-336.
- Mather K. Polygenic inheritance and natural selection. *Biol. Rev.* 1943; 18:32-64.
- Mather K. The genetical basis of heterosis. *Proc. Roy. Soc., ser. B.* 1955;144:915.
- Matzinger D., Kemothorne O. The modified diallel table with partial inbreeding and interaction with environment. *Genetics.* 1956;41: 822-833.
- McCune A., Fuller R., Aquilina A., Dawley R., Fadool J., Houle D., Travis J., Kondrashov A. A low genomic number of recessive lethals in natural populations of bluefin killifish and zebrafish. *Science.* 2002;296:2398-2401. DOI 10.1126/science.1071757.
- McMullen M.D., Kresovich S., Villeda H.S., Bradbury P., Li H., Sun Q., Flint-Garcia S., Thornsberry J., Acharya C., Bottoms C., Brown P., Browne C. Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science.* 2009;325:737-740. DOI 10.1126/science.1174320.
- Melchinger A.E. Optimum prediction of three-way crosses from single crosses from single crosses in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1987;74:339-345. DOI 10.1007/BF00274716.
- Melchinger A.E., Gumber R.K. Overview of heterosis and heterotic crops in agronomic crops. Eds K.L. Lamkey, J.E. Staub. Concepts and breeding of heterotic crop plants. Crop Science Society of America, Madison, 1998;29-44. DOI 10.2135/cssaspepub25.c3.
- Melchinger A.E., Piepho H.P., Utz H.F. Genetic basis of heterosis for growth-related traits in *Arabidopsis* investigated by testcross prog-

- enies of near-isogenic lines reveals a significant role of epistasis. *Genetics*. 2007a;177(3):1827-1837. DOI 10.1534/genetics.107.080564.
- Melchinger A.E., Utz H.F., Piepo H.P., Zeng Z.-B., Schon C.C. The role of epistasis in the manifestation of heterosis: A systems-oriented approach. *Genetics*. 2007b;177:1815-1825. DOI 10.1534/genetics.107.077537.
- Ohnishi O. Population genetics of cultivated buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. I. Frequency of chlorophyll-deficient mutants in Japanese populations. *Jpn. J. Genet.* 1982;57:623-639. DOI 10.1266/jjg.57.623.
- Ohnishi O. Population genetics of cultivated buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. III. Frequency of sterility mutants in Japanese populations. *Jpn. J. Genet.* 1985;60:391-404. DOI <http://doi.org/10.1266/jjg.60.391>.
- Ong-Abdullah M., Ordway J.M., Jiang N., Martienssen R. Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature*. 2015;525(7570):533-537. DOI 10.1038/nature15365.
- Phillips P.C. Epistasis – the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Rev. Gen.* 2008;9:855-867. DOI 10.1038/nrg2452.
- Redei G.P. Single locus heterosis. *Mol. Gen. Genom.* 1962;93:164-170.
- Reif J.C., Hallauer A.R., Melchinger A.E. Heterosis and heterotic pattern in Maize. *Maydica*. 2005;50:215-223.
- Reif J.C., Kusterer B., Piepo H.-P., Meyer R.C., Altmann Th., Schön Ch.C., Melchinger A.E. Unraveling Epistasis With Triple Testcross Progenies of Near-Isogenic Lines. *Genetics*. 2009;181:247-257. DOI 10.1534/genetics.108.093047.
- Rice J.S., Dudley J.W. Gene effects responsible for inbreeding depression in autotetraploid maize. *Crop Science*. 1974;14:390-393. DOI 10.2135/cropsci1974.0011183X001400030015x.
- Schon C.C., Dhillon B.S., Utz H.F., Melchinger A.E. High congruency of QTL positions for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(2):321-332. DOI 10.1007/s00122-009-1209-9.
- Schwartz D., Laughner W.J. A molecular basis for heterosis. *Science*. 1969;166(3905):626-627. DOI 10.1126/science.166.3905.626.
- Semel Y., Nissenbaum J., Menda N., Zinder M., Krieger U., Issman N., Pleban T., Lippman Z., Gur A., Zamir D. Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006;103:12981-12986. DOI 10.1073/pnas.0604635103.
- Shapturnenko M.N., Tarutina L.A., Mishin L.A., Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. DNA divergence as a criterion of a sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) selection for heterosis. *Rus. J. Genetics*. 2014;50(2):123-130. DOI 10.1134/S1022795414020148.
- Shapturnenko M.N., Tarutina L.A., Mishin L.A., Kubrak S.V., Kilchevskiy A.V., Khotyleva L. The possibilities of the prediction of the genetic potential of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) F₁ based on the assessment of a simple sequence research polymorphism. *Rus. J. Genetics: Applied Research*. 2015;5(5):486-493. DOI 10.1134/S207905971505010X.
- Shull G.H. The composition of a field of maize. *Amer. Breeders Assoc. Rep.* 1908;4:296-301. <http://old.weedtowonder.org/hybrid/papers/>.
- Shull G.H. Duplicated genes for capsule form in *Bursa bursapastoris*. *Zeitschrift indikative Abstammungs-, Vererbungslehre*. 1914;12:97-149.
- Shull G.H. Beginnings of the heterosis concept: J.W. Gowen (Ed.). *Heterosis*. Iowa State College Press, Ames, IA, 1952;14-48.
- Singh R., Low E.-T., Ooi L., Ong-Abdullah M., Ting N.-Ch., Nagapan J., Nookiah R., Amiruddin M., Rosli R., Manaf M., Chan K.-L., Halim M., Azizi N., Lakey N., Smith, S. Budiman M., Hogan M., Bacher B., Brunt A., Wang Ch., Ordway J., Sambanthamurthi R., Martienssen R. The oil palm *SHELL* gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature*. 2013;500:340-344. DOI 10.1038/nature12356.
- Sprague G.F., Russell W.A., Penny L.H., Horner T.W. Effects of epistasis on grain yield of maize. *Crop Science*. 1962;2:205-220.
- Sprague G.F., Tatum L.A. General vs specific combining ability in single crosses of corn. *J. Amer. Soc. Agron.* 1942;34:923-932.
- Springer N., Stupar R. Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than whole? *Genome Res.* 2007;17:264-275. DOI 10.1101/gr.5347007.
- Srivastava H.K. Heterosis and complementation of isolated mitochondria from several wheat varieties. *Indian J. Exp. Biol.* 1974;12(1):79-81.
- Stuber C.W., Lincoln S.E., Wolff D.W., Helentjaris T., Lander E.S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*. 1992;132:823-839.
- Sved J.A. An estimate of heterosis in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.* 1971;18:97-105.
- Tai G.C. Genotypic stability analysis and its application to potato regional trial. *Grop Sci*. 1971;11(2):184-194.
- Tarutina L.A., Poskannaya S.I., Kapusta I.B., Mishin L.I., Khotyleva L.V. Genetic control of the character fruit weight per plant in sweet pepper in the diallel cross: materials of International scientific conference "Plant genefund accumulation evaluation and protection in the botanical gardens" (1-2 July 1999, Vilnius). *Vilnius*, 1999;157-159.
- The hybrid wheat website. <http://www.hybridwheat.net/>.
- Troyer A.F., Wellin E.J. Heterosis Decreasing in Hybrids: Yield Test Inbreds. *Crop Science*. 2009;49:1969-1976. DOI 10.2135/cropsci2009.04.0170.
- Wang J., Hill W.G., Charlesworth D., Charlesworth B. Dynamics of inbreeding depression due to deleterious mutations in small populations: I. Mutation parameters and inbreeding rate. *Genet. Res.* 1999;74:165-178.
- Wang Y., Mette M., Miedaner Th., Gottwald M., Wilde P., Reif J., Zhao Y. The accuracy of prediction of genomic selection in elite hybrid rye populations surpassed the accuracy of marker-assisted selection and is equally augmented by multiple field evaluation locations and test years. *BMS Genomics*. 2014;15:556. DOI 10.1186/1471-2164-15-556.
- Willis J.H. The role of genes of large effect on inbreeding depression in *Mimulus guttatus*. *Evolution*. 1999;53:1678-1691. DOI 10.2307/2640431.
- Wolf D.P., Hallauer A.R. Triple testcross analysis to detect epistasis in maize. *Crop Science*. 1997;37(3):763-770. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700030012x.
- Wricke G. Über eine Methode zur Erfassung der ökologischen Sfeubreite in Feldsuchungen. 2. *Pflanzenzüchtung*. 1962;47(1):92-96.



Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии

А.В. Смирнов¹, А.М. Юнусова¹, В.А. Лукьянчикова¹, Н.Р. Баттулин^{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 «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Система CRISPR/Cas9 была изначально описана как механизм адаптивного иммунитета архей и бактерий, однако после ряда модификаций она нашла активное применение в геномной инженерии, благодаря способности вносить направленный ДНК-разрыв с помощью короткого программируемого 20-нуклеотидного района в направляющей молекуле РНК (single guide RNA, sgРНК). Обзор посвящен современным приложениям системы CRISPR/Cas9 в геномной инженерии. В первой его части описан основной механизм действия CRISPR/Cas9, особо уделено внимание причинам неспецифической активности Cas9 (off-targets). Она выражается в связывании комплексом Cas9-sgРНК нецелевых геномных участков, имеющих лишь частичную гомологию с sgРНК, что может приводить к нежелательным мутациям в геноме. В обзоре обсуждаются недавние улучшения специфичности связывания Cas9 и подходов по расширению функций CRISPR/Cas9 для трансгенеза. Популярность системы CRISPR/Cas9 в основном обусловлена ее выдающимся потенциалом для геномной терапии и геномной инженерии, и последние достижения в этих областях представлены в нашем обзоре. В частности, CRISPR/Cas9 была недавно использована для контроля заражения клеток ВИЧ (вирусом иммунодефицита человека) и исправления генетических нарушений, таких как мышечная дистрофия Дюшенна и пигментный ретинит, на культурах клеток и животных моделях. Программируемость CRISPR/Cas9 облегчает создание трансгенных организмов с направленными генными мутациями, встройками генов и крупными хромосомными перестройками. Система CRISPR/Cas9 оказалась особенно востребованной для пронуCLEARной микроинъекции при получении трансгенных сельскохозяйственных животных в биотехнологии. Один из разделов обзора посвящен генетическим скринингам на основе CRISPR/Cas9, которые приводят к высокоэффективной идентификации новых генов и генных сетей во многих биологических процессах. Наконец, в обзоре рассматривается технология генных драйверов, основанная на CRISPR/Cas9, которая представляет собой мощный инструмент для модификации экосистем в обозримом будущем.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; редактирование генома; трансгенез; клеточная терапия; мутагенная цепная реакция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175

УДК 57.088

Поступила в редакцию 17.03.2016 г.

Принята к публикации 20.05.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

✉ e-mail: battulin@gmail.com

CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering

A.V. Smirnov¹, A.M. Yunusova¹,
V.A. Lukyanchikova¹, N.R. Battulin^{1, 2} ✉

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The CRISPR/Cas9 system was initially described as an element of archeal and bacterial immunity, but gained much attention recently for its outstanding ability to be programmed to target any genomic loci through a short 20-nucleotide sgRNA region. Here we review some modern applications of the CRISPR/Cas9 system. First, we describe the basic mechanism of the CRISPR/Cas9 DNA recognition and binding, focusing in particular on its off-target activity. The CRISPR/Cas9 off-target activity refers to a non-specific recognition of genomic sites that have partial homology with sgRNA, occasionally resulting in unwanted mutations throughout the genome. We also note some recent improvements for enhancing Cas9 specificity or adding new functions to the system. Since Cas9-related hype is mostly driven by its remarkable potential for gene therapy and genome engineering, the latest CRISPR/Cas9 applications in these areas are also covered in our review. For instance, the CRISPR/Cas9 was recently used to control HIV infection and to repair genetic abnormalities, such as Duchenne muscular dystrophy or retinitis pigmentosa, both in cell cultures and rodent models. A programmable nature of CRISPR/Cas9 facilitates the creation of transgenic organisms through site-specific gene mutations, knock-ins or large chromosomal rearrangements (deletions, inversions and duplications). CRISPR/Cas9 proved to be especially useful in pronuclear microinjections of farm animals as well, having strong impact on biotechnology. In addition, we review Cas9-augmented genetic screens that allow an unbiased search for new genes and pathways involved in a plethora of biological aspects, owing to Cas9 efficiency and versatility. Finally, we argue that gene drivers based on CRISPR/Cas9 represent a powerful tool to modify ecosystems in the nearest future.

Key words: CRISPR/Cas9; genome editing; transgenesis; cell therapy; mutagenic chain reaction.

По усредненным оценкам, в мире обнаружено более миллиона видов эукариотических организмов, при этом миллионы эукариот и бактерий все еще остаются неопианными (Mora et al., 2011; Costello et al., 2013). Так как геном каждого вида в чем-то уникален, их изучение принесет неисчислимое количество неожиданных открытий. Однако даже исследование генов небольшого числа организмов, с которыми работают в лабораториях, представляет проблему. Для того чтобы понять функции отдельных элементов генома и то, как формируются конкретные признаки организмов, необходима разработка универсального инструментария для направленного редактирования генома: адресной «поломки» или «замены» генов. Для человечества контроль над редактированием генома будет означать избавление от наследственных генетических заболеваний, возможность модификации окружающих нас биоценозов, а также производство новых материалов и лекарств силами биотехнологии. Поэтому генетические инструменты для редактирования генома стали одним из самых востребованных открытий последних лет. На сегодняшний момент наибольшее распространение получили три метода: цинковопальцевые нуклеазы (ZFN), TALE-ассоциированные нуклеазы (Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALEN) и CRISPR/Cas9 (Wijśhake et al., 2014). Несмотря на то что они сопоставимы по многим параметрам, определяющим эффективность, один из методов, CRISPR/Cas9, благодаря своей простоте оставил конкурентов далеко позади. Всего за три года система CRISPR/Cas9 стремительно перешла рубеж, который отделяет «многообещающую и перспективную технологию» от инструмента, принятого на вооружение в тысячах лабораторий по всему миру. В 2016 г. каждую неделю публикуется более 30 работ, в которых упоминается система CRISPR/Cas9. Не пытаясь охватить всю область применения CRISPR/Cas9, в этом обзоре мы обратили свое внимание на самые актуальные направления, которые будут иметь значительное влияние на медицину и биотехнологию. Более подробную информацию можно найти в специализированных обзорах и компиляциях, указанных в начале каждого из разделов.

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas – это система адаптивного приобретенного иммунитета бактерий и архей, направленная на уничтожение проникшей в клетку чужеродной ДНК, например, фагов или плазмид (Barrangou et al., 2007). В русском языке пока не достигнут консенсус о переводе названия CRISPR/Cas (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)–CRISPR-associated system (Cas)). Название можно представить как «сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные промежутками, и ассоциированная с ними система». Бактериальный CRISPR-локус содержит уникальные фрагменты чужеродной ДНК (промежутки или спейсеры в англоязычной литературе) и сохраненные организмом после инфекции вирусными или плазмидами, а также полученные извне. В случае повторного вторжения с CRISPR-локуса транскрибируется протяженная молекула РНК, которая фрагментируется комплексом белков CRISPR/Cas-системы

и вспомогательных РНК. Нарботанные РНК-молекулы при участии белков CRISPR/Cas-системы связывают и разрезают комплементарные участки чужеродной геномной ДНК (протоспейсеры). Важно, что связывание и деградация ДНК протоспейсера происходят только в присутствии специфического нуклеотидного сегмента (protospacer adjacent motif, PAM), который может иметь у разных видов бактерий разные последовательность и размер (Makarova et al., 2015). Наличие PAM-участка служит своеобразным опознавательным сигналом чужеродной ДНК и позволяет избегать разрезания собственных спейсерных районов CRISPR-локуса. CRISPR/Cas-системы подразделяются по происхождению и механизму действия на пять основных типов (см. обзор (Makarova et al., 2015)).

Нуклеаза SpCas9 (*Streptococcus pyogenes*), которая на сегодняшний день применяется в геномной инженерии чаще всего, является центральной темой нашего обзора. SpCas9 принадлежит ко второму типу CRISPR/Cas-систем. В отличие от нуклеаз других CRISPR-семейств, SpCas9 (далее Cas9) не требует дополнительных белков-кофакторов для связывания и разрезания ДНК. В естественных условиях для активации Cas9-нуклеазы необходимы две РНК: CRISPR-ассоциированная РНК (crRNA), происходящая из геномного локуса, хранящего фрагменты вирусных последовательностей; а также транс-активирующая РНК (tracrRNA), лицензирующая активность комплекса Cas9-РНК (подробное описание механизма см. в обзоре (Wright et al., 2016)). Однако для целей геномной инженерии две РНК объединены в составе одной химерной молекулы sgРНК (single guide RNA). Молекула sgРНК включает участок длиной 19–20 нуклеотидов, который должен быть комплементарен целевому участку генома, и функциональные элементы tracrRNA и crRNA, полная длина sgRNA составляет от 100 до 250 п. н. Для связи Cas9 с ДНК также необходим участок из трех нуклеотидов вида NGG (PAM), непосредственно прилегающий с 3'-конца к целевому сайту связывания sgРНК в геноме. После связывания с комплементарным sgРНК участком ДНК Cas9 разрезает обе нити ДНК на расстоянии в три нуклеотида от PAM, формируя двухцепочечный разрыв ДНК с тупыми концами. Система CRISPR/Cas9 легко подвергается модификациям: от изменений вторичной структуры sgРНК до мутаций специфических аминокислот в Cas9 или присоединения функциональных доменов других белков (рис. 1).

Механизм действия системы CRISPR/Cas9

Сайт-специфичные нуклеазы разного происхождения, такие как I-SceI, ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9, используются биологами с определенной целью: для внесения одноцепочечных или двухцепочечных разрывов ДНК в интересующие участки генома. Несмотря на схожее назначение, сайт-специфичные нуклеазы по-разному взаимодействуют с ДНК. К примеру, мегануклеаза I-SceI связывает и разрезает уникальный мотив из 18 п. н., оставляя выступающие 3'-концы длиной в четыре нуклеотида. Цинковопальцевые и TALE-ассоциированные нуклеазы распознают целевой участок генома посредством модульных ДНК-связывающих доменов, а разрыв в геном вносится при помощи димеризующихся FokI-доменов. Нуклеаза CRISPR/Cas9 имеет специфический механизм

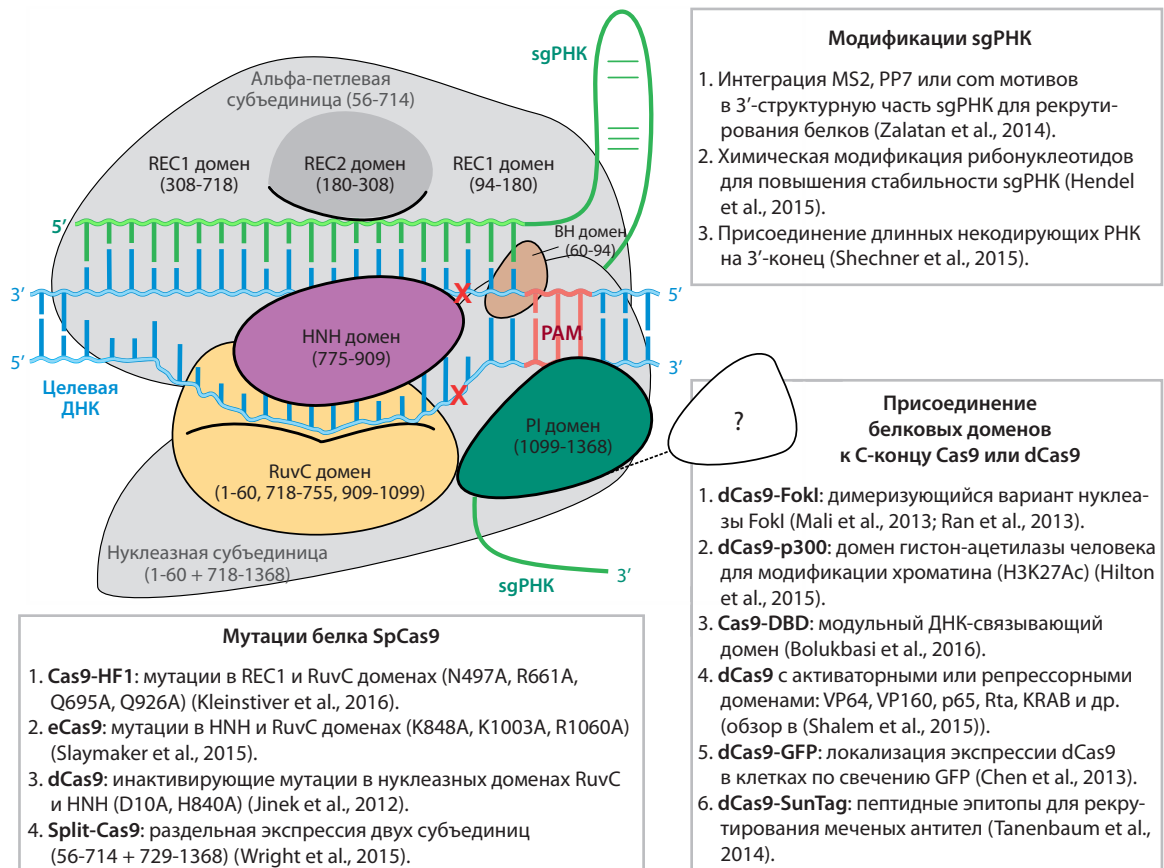


Рис. 1. Схема комплекса SpCas9-sgРНК на ДНК.

Числами обозначены размеры и порядок белковых доменов (в аминокислотах). Приведены различные модификации элементов системы CRISPR/Cas9.

действия, и его расшифровка в 2014 г. значительно подтолкнула развитие всей геномной инженерии.

Несмотря на то что первое описание CRISPR-локуса было сделано еще в 1980-х гг., а с 2011 г. велись эксперименты по направленному внесению двухцепочечных разрывов в ДНК-последовательность с помощью Cas-нуклеаз, понимание механизма действия эндонуклеазы SpCas9 появилось только после серии работ с участием одного из первооткрывателей и активных исследователей SpCas9 М. Жинека в 2014 г. (Anders et al., 2014; Jinek et al., 2014; Sternberg et al., 2014) (детали см. в обзоре (Wright et al., 2016)).

В статье S.H. Sternberg с коллегами (2014) описан процесс поиска специфичного сайта ДНК нуклеазой SpCas9, связанной с sgРНК. Проведя сложные биохимические эксперименты, такие как визуализация SpCas9 на растянутых фиксированных ДНК-нитех фага лямбда и *in vitro* связывание SpCas9 с ДНК, содержащей разное число PAM-сайтов, они выяснили динамику связывания нуклеазы и ДНК. Оказалось, что SpCas9 в комплексе с sgРНК производит поиск комплементарных сайтов ДНК за счет случайных трехмерных столкновений с ДНК хромосом. Присутствие PAM стабилизирует комплекс SpCas9-ДНК и инициирует расплетание ДНК-дуплекса. По данным ChIP-seq анализа, проведенного на белке с инактивированной нуклеазой

активностью (nuclease-deficient Cas9, dCas9), комплекс dCas9-sgРНК слабо связывается с большим количеством геномных сайтов, содержащих PAM и 5–8 нуклеотидов комплементарности с sgРНК, расположенных рядом с PAM (более 100 участков для некоторых sgРНК), однако разрезания неспецифических участков почти не происходит без стабилизации комплекса (Kuscu et al., 2014; Wu et al., 2014). Комплекс же SpCas9-ДНК в присутствии полностью комплементарной sgРНК очень стабилен, поэтому для его удаления с места разрыва необходимо действие других белков клетки. В работе С. Anders с коллегами (2014) анализ кристаллической структуры белка SpCas9 в комплексе с sgРНК и ДНК показал роль PAM-участка для стабилизации РНК-ДНК дуплекса. PAM-участок жестко связывается с некоторыми белковыми доменами SpCas9 (PAM-взаимодействующие домены) (Nishimasu et al., 2014) и образует небольшое выпячивание молекулы ДНК, облегчая доступ к первому нуклеотиду сайта узнавания sgРНК. Два гуанина в составе PAM образуют водородные связи с аминокислотами Arg 1333 и Arg 1335 С-концевого участка SpCas9. Мутации двух этих аминокислот значительно снижают эффективность SpCas9 в разрезании ДНК. Взаимодействие двух гуанинов PAM с SpCas9 помогает точнее сориентировать первый, неспецифический нуклеотид PAM-участка. Он образует

водородные связи с группой аминокислот, которые называются «фосфатным замком», и выворачивается из ДНК дуплекса, что приводит к инициации спаривания цепей sgРНК и комплементарной ей одноцепочечной нити ДНК. Интересно, что даже при отсутствии комплементарной последовательности в sgРНК РАМ-белковые взаимодействия способны создать локальное расплетание ДНК-дуплекса на один нуклеотид. Процесс поиска и разрезания ДНК-участков для белка SpCas9 оказался следующим: (1) формирование комплекса SpCas9 с sgРНК. При связывании белка Cas9 с молекулой sgРНК происходит поворот двух субъединиц Cas9 (альфа-петлевой (56–714 а.к.) и нуклеазной (1–57+718–1368 а.к.)) относительно друг друга на 100° (Jinek et al., 2014). Изменение конформации открывает участки связывания ДНК в центре молекулы Cas9. Две субъединицы – ДНК-связывающая и нуклеазная – взаимодействуют только посредством sgРНК, которая, таким образом, играет ключевую роль в активации Cas9. Это подтверждается и тем, что раздельная экспрессия двух белковых субъединиц Cas9 (split-Cas9) приводит к сборке функциональной нуклеазы, так как кооперация фрагментов осуществляется через sgРНК (Wright et al., 2015). После активации Cas9 происходят (2) случайные столкновения комплекса с хромосомной ДНК, затем (3) слабые взаимодействия белка SpCas9 с РАМ-участками (NGG), разбросанными по геному, (4) водородные связи РАМ с С-концевым РАМ-взаимодействующим доменом SpCas9 инициируют расплетание ДНК-дуплекса перед РАМ на один нуклеотид, но только (5) наличие комплементарной sgРНК стимулирует расплетание целевого ДНК-дуплекса. Наконец, (6) одноцепочечные молекулы ДНК разрезаются двумя нуклеазными доменами SpCas9 (RuvC, HNH).

Информация о кристаллической структуре SpCas9 служит для «приручения» нуклеазы в целях генной терапии и создания белков с повышенной специфичностью. Недавно были описаны результаты масштабного мутирования ДНК и sgРНК-связывающих доменов Cas9, что позволяет снизить избыточную термодинамическую стабильность комплекса Cas9-ДНК, допускающую мисматчи в sgРНК-участке. Двумя независимыми группами ученых были получены мутанты Cas9: High Fidelity Cas9 (Kleinstiver et al., 2016) и Enhanced Cas9 (Slaymaker et al., 2015). В работе В.Р. Kleinstiver с коллегами заменялись аминокислоты, взаимодействующие с ДНК-sgРНК дуплексом (N497A, R661A, Q695A, Q926A). Во втором исследовании мутировались аминокислоты, связывающие одноцепочечную ДНК (K848A, K1003A, R1060A) (см. схему в краткой заметке (Nelson, Gersbach, 2016)). Таким образом, комплекс мутантного «ослабленного» белка Cas9 на ДНК стабилизируется только в присутствии идеально комплементарной sgРНК. Это почти не сказывается на эффективности разрезания sgРНК, но значительно снижает число неспецифических сайтов разрезания в геноме (off-targets) (неспецифической активности Cas9 посвящен следующий раздел обзора). Ожидается, что улучшение специфичности SpCas9 ускорит работу в области клеточной терапии человека, так как высокая точность нуклеаз снимает необходимость тщательного скрининга off-target мутаций в геноме.

Более сложной альтернативой описанному подходу выглядит присоединение к Cas9 белков, повышающих специфичность связывания с ДНК на основе модульных доменов цинковопальцевых нуклеаз (Bolukbasi et al., 2016). Авторы решили создать химерный белок Cas9, соединенный на С-конце с четырьмя ДНК-связывающими доменами, узнающими участок из 12 нуклеотидов на расстоянии примерно 7–15 нуклеотидов от РАМ (в 3'-направлении). В структуру Cas9 были внесены мутации, нарушающие связывание нуклеазы с РАМ и ДНК, которые делают Cas9 зависимым от ДНК-связывающего домена. Система на основе Cas9 и ДНК-связывающих доменов не очень удобна для обычных приложений, так как репрограммирование ДНК-связывающих доменов занимает время и ограничивает число доступных геномных сайтов. Этот метод можно использовать для генной терапии клеток человека, когда сайты-мишени в геноме хорошо охарактеризованы и ДНК-связывающие домены протестированы заранее.

К настоящему моменту внимание научного сообщества направлено на адаптацию белка SpCas9 для различных задач, тем не менее, применение ортологических Cas9 белков из различных видов бактерий и архей может оказаться полезным в будущем. Сейчас ведутся поиски среди сотен CRISPR-ассоциированных нуклеаз из других видов бактерий и архей. Основные требования к ортологам Cas9 включают, помимо высокой эндонуклеазной активности, небольшой размер для облегчения упаковки в вирусы и узнавание различных РАМ-участков для расширения возможностей дизайна sgРНК. К примеру, нуклеаза SaCas9 из *Staphylococcus aureus* узнает РАМ вида 5'-NNGRRT-3', ее кодирующая последовательность короче гена *SpCas9* на 1000 п.н. Меньший размер позволяет использовать для ее доставки аденоассоциированные вирусы (AAV). Кристаллическая структура белка SaCas9 похожа на SpCas9, за исключением доменов, взаимодействующих с РАМ-проксимальным участком и структурными элементами sgРНК (Nishimasu et al., 2015). Нуклеаза NmCas9 (*Neisseria meningitidis*) связывает РАМ вида 5'-NNNNGATT-3', что позволяет выбирать геномные сайты, недоступные другим нуклеазам (Hou et al., 2013). Стоит отметить, что CRISPR-ассоциированные нуклеазы из других семейств также имеют большой потенциал для генной терапии. Так, нуклеаза Cpf1 из бактерии *Francisella novicida* (пятый тип CRISPR-систем) имеет размер в 1,3 тыс. аминокислот (SpCas9 – примерно 1,6 тыс.) и направляется к месту разрыва коротким аналогом sgРНК (44 п.н.) (Zetsche et al., 2015a). Было показано, что Cpf1 эффективно модифицирует ДНК в клетках человека (Zetsche et al., 2015a). Cpf1 распознает РАМ вида TTN, при этом сайт прилегает к 5'-концу направляющей РНК, в отличие от SpCas9. Двухцепочечный разрыв ДНК вносится на расстоянии примерно 20 п.н. от РАМ, формируя короткие 5'-одноцепочечные участки. Тот факт, что разрыв в ДНК возникает на удалении от РАМ, позволяет проводить генную модификацию одного геномного сайта несколько раз, так как мутагенез не разрушает участок связывания sgРНК с ДНК, как происходит в случае с SpCas9.

Специфичность Cas9 и нецелевая активность

Одна из горячих тем в области использования CRISPR/Cas9 – ее неспецифическая активность в нецелевых участках генома (off-target сайты). Было показано, что помимо высокой сайт-специфичной активности, которая определяется наличием в целевом сайте PAM-участка и 20 нуклеотидов, комплементарных sgPНК, комплекс Cas9-sgPНК может вносить разрыв в ДНК при наличии PAM и неполной гомологии с sgPНК вплоть до трех–пяти несовпадающих нуклеотидов (Cong et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013; Mali et al., 2013; Pattanayak et al., 2013).

В большинстве случаев off-target активность CRISPR/Cas9 представляет собой нежелательный побочный эффект, от которого пытаются избавиться. Для этого было предложено несколько стратегий. Так, было показано, что простое уменьшение количества активных молекул Cas9 в клетке позволяет снизить off-target активность. Однако в итоге также падает и целевая активность системы (Hsu et al., 2013; Davis et al., 2015; Zetsche et al., 2015b). Поскольку мутация в off-target сайте происходит за счет репарации двухцепочечного разрыва ДНК, одна из стратегий предполагает использовать мутантные варианты Cas9, вносящие одноцепочечный разрыв (ник). При этом редактирование целевого локуса и внесение двухцепочечного разрыва в ДНК осуществляются за счет применения пары sgPНК и никирующей Cas9, создающих два близлежащих ника на обеих цепях в целевом участке генома (Mali et al., 2013; Ran et al., 2013). Так как off-target сайты обычно разделены в геноме большими расстояниями, вероятность внесения близлежащих ников где-либо, кроме целевого сайта, оказывается ничтожной. Одиночные же ники репарируются клетками по механизму высокоточной эксцизионной репарации оснований (Dianov et al., 2013). Похожая стратегия уменьшения off-target активности CRISPR/Cas9 была предложена при использовании каталитически неактивного белка dCas9, сшитого с нуклеазным доменом FokI. В этом случае также за счет использования двух sgPНК в целевом сайте происходят сближение молекул dCas9-FokI и внесение двухцепочечного разрыва в ДНК в результате димеризации FokI-доменов (Guilinger et al., 2014; Tsai et al., 2014). Однако необходимость дизайна двух sgPНК для модификации одного локуса уменьшает число доступных для редактирования локусов и усложняет методику в целом.

Ранее в обзоре обсуждалось, что стабильность комплекса Cas9-sgPНК на геномной ДНК коррелирует с off-target активностью. Избыточная энергия взаимодействия белка Cas9 с PAM целевого сайта может стабилизировать весь комплекс Cas9-sgPНК-ДНК при связывании его с off-target сайтом даже при множестве неправильно спаренных оснований. Существует несколько указаний на важность стабильности комплекса для эффективного внесения разрыва в ДНК. Было показано, что разрезание ДНК ферментом Cas9 происходит после разделения цепей целевого сайта (Anders et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). Причем наличие неправильно спаренных оснований между sgPНК и целевым ДНК-сайтом в области 1–12 нуклеотидов относительно PAM ингибирует нуклеазную активность Cas9. Но нуклеазная активность восстанавливается, если целевая двухцепочечная последовательность

ДНК при этом сама будет содержать ошибочно спаренные ДНК нуклеотиды (Semenova et al., 2011; Wiedenheft et al., 2011; Sternberg et al., 2014). Наличие в целевом сайте ДНК вставок или делеций нуклеотидов также частично игнорируется при связывании с sgPНК (Lin et al., 2014). Современные алгоритмы дизайна sgPНК учитывают возможные мисматчи и инделлы при анализе целевого сайта для повышения специфичности разрезания Cas9 (Doench et al., 2016).

В некоторых работах было показано, что модификации sgPНК также позволяют уменьшить off-target активность системы CRISPR/Cas9 (рис. 2). Так, добавление двух дополнительных гуаниновых нуклеотидов на 5'-конце молекулы sgPНК приводило к уменьшению off-target активности без уменьшения целевой активности для большей части протестированных sgPНК. Этот эффект, по-видимому, достигался за счет изменения стабильности связывания sgPНК или ее вторичной структуры (Cho et al., 2014). Укорочение sgPНК на три нуклеотида также сильно снижает off-target активность из-за уменьшения энергии связывания комплекса Cas9-sgPНК с ДНК (Fu et al., 2014; Wyvekens et al., 2015).

Для того чтобы улучшить алгоритмы по дизайну sgPНК, была предпринята попытка статистического анализа связи между нуклеотидной последовательностью sgPНК и эффективностью разрезания целевого участка генома. Исследователи из Америки и Японии (Liu et al., 2016) оценили активность более чем 200 sgPНК, равномерно распределенных по геному мыши, с помощью нуклеазного теста (Surveyor nuclease assay). Оказалось, что среди 218 sgPНК для 89 sgPНК (41 %) вообще не обнаруживалось детектируемой активности. С практической точки зрения, это означает, что необходимо тестировать несколько sgPНК перед проведением экспериментов с CRISPR/Cas9. В дополнение к этому наблюдению авторы заметили ряд закономерностей. Во-первых, на активность sgPНК влияют нуклеотиды в позициях 2, 3, 6, и 20, если считать от 5'-конца sgPНК. Двадцатый нуклеотид sgPНК, предваряющий PAM-последовательность, важен для инициации расплетания ДНК и стабилизации dCas9-sgPНК-ДНК комплекса вместе с PAM. sgPНК, имеющие на этой позиции аденин, как правило, показывают сниженную активность. Интересно, что некоторые нуклеотиды в позициях 2 (тимин), 3 (гуанин), и 6 (аденин), тоже отрицательно влияли на активность sgPНК. Традиционно считается, что 5'-конец sgPНК (дистальный от PAM) не играет большой роли в распознавании целевого участка в геноме. Авторы же предполагают, что ослабленные взаимодействия нуклеотидов 2 и 4–6 с Rec1-доменом белка SpCas9 снижают эффективность связывания комплекса с ДНК (Liu et al., 2016). Также с эффективностью разрезания ДНК положительно коррелировали сбалансированный GC-состав sgPНК (40–60 %), способность sgPНК образовывать вторичную структуру и активный хроматин в области разрыва (промоторные районы) (Liu et al., 2016). Этими наблюдениями можно пользоваться при создании sgPНК для экспериментальной работы (рис. 2). Актуальные программы для дизайна экспериментов с CRISPR/Cas9 и подбора sgPНК перечислены в сводном метаобзоре D.B. Graham and D.E. Root (2015).

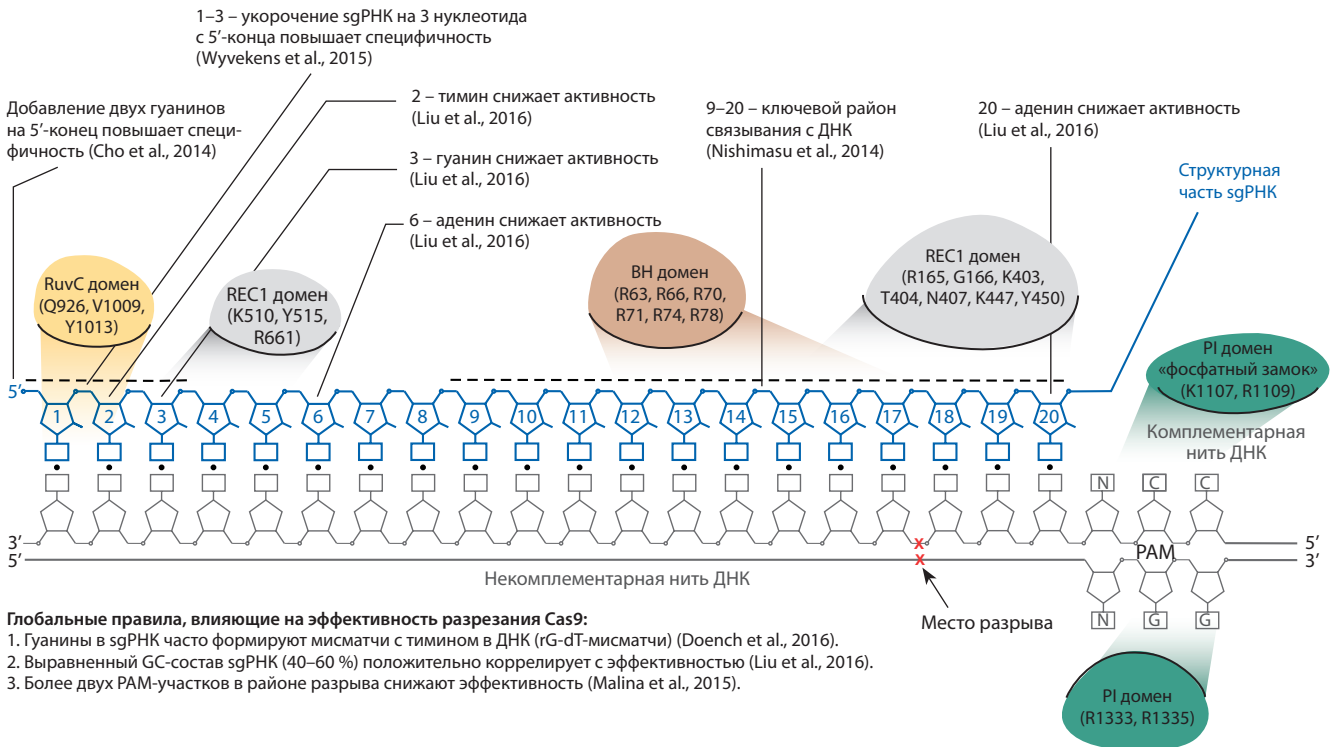


Рис. 2. Схема sgRNA на ДНК.

Указаны белковые взаимодействия Cas9 с sgRNA и PAM-участком ДНК, по данным (Anders et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). Отмечены ключевые нуклеотиды sgRNA, влияющие на эффективность разрезания Cas9.

Особое значение off-target активность CRISPR/Cas9 приобретает в работах по клеточной терапии, поскольку предполагается, что после редактирования генома клетки будут вводиться в организм человека. Мутации, возникшие в результате внесения разрыва ДНК в нецелевом локусе, потенциально могут менять активность генов и приводить к опухолевому перерождению клеток. Проблема осложняется еще и индивидуальными особенностями генома каждого человека. Ведь для того чтобы уменьшить вероятность возникновения off-target эффектов, необходимо выбирать такие sgRNA, которые имеют минимальное количество похожих сайтов в геноме конкретного человека. Экспериментальная оценка этого эффекта была проведена в работе L. Yang с коллегами (2014) в эксперименте по нокауту гена *Tafazzin (TAZ)* в эмбриональных стволовых клетках человека. Выбранная sgRNA с высокой эффективностью направляла Cas9 к целевому сайту, так что в 54 % клеток он оказывался мутированным. С помощью глубокого секвенирования генома авторы попытались картировать все off-target мутации, возникшие после проведения геномного редактирования (Yang et al., 2014). Помимо целевого сайта, были также проверены 31 потенциальный off-target сайт, отличающийся от целевого тремя нуклеотидами (высокоспецифичная sgRNA была подобрана таким образом, что в геноме не было похожих на нее сайтов с одним или двумя мисматчами). Было показано, что во всех потенциальных off-target сайтах частота возникновения мутаций была крайне низкой (примерно 0,15 %), за исключением одного участка, для которого уровень возникновения мутаций был оценен

в 18,9 %. Детальный анализ показал, что столь высокий уровень off-target активности в данном сайте объясняется наличием SNP в геноме клеточной линии. В референсном геноме, который использовался при выборе sgRNA, данный сайт нес мисматчи по трем нуклеотидам в позициях 11, 15 и 19 относительно PAM, однако геном использованной линии отличался от референсного, и в реальности не совпадали только нуклеотиды в позициях 15 и 19 (Yang et al., 2014). Поскольку известно, что первые 10–12 нуклеотидов после PAM имеют наибольшее влияние на специфичность Cas9 (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013), неудивительно, что данный off-target сайт модифицировался с высокой частотой. *In silico* анализ показал, что если для оценки специфичности sgRNA не используется геном конкретного человека, клетки которого будут подвергаться геномному редактированию, то вероятность присутствия высокоактивных off-target сайтов для sgRNA из-за SNP составляет от 1,5 до 8,5 %, в зависимости от используемого алгоритма анализа. Важно отметить, что вне целевого и потенциальных off-target сайтов CRISPR/Cas9 не вызывает увеличения частоты небольших инсерций, делеций и геномных перестроек (Yang et al., 2014). Таким образом, для минимизации возможных изменений генома при геномном редактировании для целей клеточной терапии необходимо использовать геном конкретного пациента.

Системы репарации ДНК – основа трансгенеза
Двухцепочечные разрывы ДНК, вносимые сайт-специфичными нуклеазами, репарируются клеткой за счет

негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) или с помощью гомологичной рекомбинации. NHEJ и, в меньшей степени, MMEJ (микрогомологичное соединение концов, microhomology-mediated end joining) действуют на протяжении всего клеточного цикла. Именно NHEJ несет ответственность за мутагенез ДНК в сайтах разрезания Cas9, так как лигирование двухщепочечных разрывов требует обработки свободных концов ДНК экзонуклеазами и заполнения однощепочечных участков полимеразой. Это может приводить к потере или вставке нуклеотидов (индел-мутации), а также к нуклеотидным заменам. Частота Cas9-обусловленного мутагенеза обычно составляет несколько десятков процентов (Geisinger et al., 2016).

В течение G2/M фазы в клетках активна гомологичная рекомбинация, при которой для восстановления информации используются сестринские хроматиды. При наличии в клетке трансгенного фрагмента ДНК с плечами, гомологичными участку генома, может происходить рекомбинация между трансгеном и свободными концами геномной ДНК, образующимися после разрезания целевого участка Cas9. Гомологичная рекомбинация максимально эффективна, если двухщепочечный разрыв располагается в 10–20 нуклеотидах от запланированного места внесения изменений в геном (Elliott et al., 1998; Yang et al., 2013b; Findlay et al., 2014). Баланс между негомологичным и гомологичным вариантами репарации ДНК во многом и определяет эффективность встройки трансгенной ДНК с помощью CRISPR/Cas9. Белки гомологичной рекомбинации присутствуют в клетке во все фазы клеточного цикла, однако лишь в S-фазе происходит их активация за счет увеличения экспрессии генов и посттрансляционных модификаций белков. Значительной проблемой для трансгенеза остается низкая частота гомологичной встройки, которая отражает фундаментальные особенности репарации ДНК в клетке. Например, плюрипотентные стволовые клетки человека модифицируются CRISPR/Cas9 с частотой менее 10 % (Liu et al., 2016), что связано с чувствительностью этого типа клеток к повреждениям ДНК. Активация гомологичной рекомбинации в нехарактерные фазы клеточного цикла, а также сдвиг равновесия между негомологичной и гомологичной рекомбинацией в пользу последней позволили бы улучшить эффективность направленной встройки трансгенов при использовании CRISPR/Cas9.

Одним из проверенных временем методов подавления NHEJ являются молекулы-ингибиторы ключевых белков NHEJ. В 2015 г. вышло несколько работ, в которых система CRISPR/Cas9 применялась в комбинации с ингибированием NHEJ. V.T. Chu с коллегами (2015) показали, что нокдаун белков канонического NHEJ (KU70, KU80 и лигазы IV) короткими шпилечными РНК (shRNA) повышал частоту гомологичной рекомбинации в два–три раза. После добавления к shРНК малой молекулы Scr7, которая блокирует ДНК-связывающий домен лигазы IV, и аденовирусных белков, E1B55K и E4orf6, опосредующих протеосомную деградацию лигазы IV, частота сайт-специфичной интеграции выросла в семь раз по сравнению с исходной. Важно, что молекула Scr7 была протестирована в экспериментах по пронуклеарной микроинъекции CRISPR/Cas9 и трансгенов. Исследователи задокументировали

повышение частоты сайт-специфичной встройки различных трансгенов в два–четыре раза при использовании Scr7, отметив также низкую токсичность (Matsuyama et al., 2015). Ингибиторы другого ключевого компонента NHEJ, ДНК-зависимой субъединицы протеинкиназы (DNA-PKcs), стимулировали направленную встройку трансгенов в два–четыре раза (Robert et al., 2015). В этой работе также был показан аддитивный эффект различных ингибиторов на эффективность подавления NHEJ.

Молекула RS-1 стабилизирует связывание белка RAD51 с ДНК. RAD51 – ключевой белок гомологичной рекомбинации, который формирует нуклеофиламенты на однощепочечной ДНК и необходим для инвазии донорного ДНК-дуплекса. Обработка клеток веществом RS-1 повышает частоту Cas9-направленной встройки в три–шесть раз (Pinder et al., 2015).

Наконец, два вещества (L755507 и Brefeldin A), обнаруженные в скрининге среди четырех тысяч малых молекул, повышали частоту гомологичной встройки трансгена в два–три раза при использовании CRISPR/Cas9, но механизм их действия на систему репарации пока не выяснен (Yu et al., 2015).

D. Yang с коллегами (2016) нашли способ повысить частоту сайт-специфического встраивания трансгена в плюрипотентных стволовых клетках человека, синхронизировав их в G2/M-фазах клеточного цикла с помощью нокодазола или АВТ-751. Синхронизация клеток стимулировала гомологичную рекомбинацию в среднем в четыре раза. Обработка синхронизированных клеток ингибитором лигазы IV (Scr7) не привела к дополнительному повышению частоты гомологичной рекомбинации, что указывает на полное ингибирование канонического пути NHEJ в этих условиях.

CRISPR/Cas9 ускоряет получение трансгенных животных при инъекции в зиготы

Традиционно модификация генома проводится на эмбриональных стволовых (ЭС) клетках, затем следуют получение химерных животных и проведение скрещиваний. Помимо того, что сам процесс довольно длительный и трудоемкий (6–12 мес. и больше), для некоторых животных до сих пор не получены линии ЭС-клеток. С помощью же системы CRISPR/Cas9 исследователи могут получить трансгенное животное за один шаг, просто инъекцировав трансген, мРНК Cas9 и sgРНК в зиготу. Кроме того, инъекция нескольких sgРНК позволяет редактировать сразу несколько участков генома: вносить делеции (Wang et al., 2013) или встраивать фрагменты ДНК с помощью гомологичной рекомбинации (Yang et al., 2013a). А в работе A.W. Cheng с коллегами (2013) была показана возможность одновременно активировать работу трех генов в зиготе мыши с помощью dCas9, сшитой с активаторным доменом VP160.

Технология была испробована на всех модельных организмах, включая дрожофилу (Bassett et al., 2013), аксолотля (Flowers et al., 2013), крысу (Hu et al., 2013) и крупных животных, таких как макаки (Niu et al., 2014). Стоит отметить, что получение трансгенных приматов до этого являлось весьма трудной задачей. Китайским ученым с помощью инъекции CRISPR/Cas9 в эмбрионы

макак-крабоедов удалось внести мутации одновременно в два гена, *Ppar1* и *Rag1* (Niu et al., 2014).

Исследователи, работающие в области биотехнологии, с энтузиазмом переняли CRISPR/Cas9 для модификации геномов крупных сельскохозяйственных животных (подробный обзор представлен у W. Tan с коллегами (2016)). Трансгенез крупных животных, как правило, осуществляется через клонирование, которое отличается очень низкой эффективностью. Применение CRISPR/Cas9 позволило облегчить генную модификацию сельскохозяйственных животных: кроликов (Yuan et al., 2016), овец (Crispo et al., 2015), коз (Ni et al., 2014) и свиней (Whitworth et al., 2014). Интересно, что две группы китайских исследователей продемонстрировали очень высокую частоту Cas9-индуцированной встройки трансгенов в зиготах свиней (Peng et al., 2015; Wang et al., 2015a). В статье J. Peng с коллегами (2015) 100 % родившихся поросят (16 из 16) несли человеческий ген альбумина в нужном локусе. Этот случай скорее исключение, чем правило. H. Wang с коллегами (2015a) наблюдали более низкую частоту направленной встройки коротких ДНК-фрагментов (ssODN) при ПЦР-анализе бластоцист свиней (13 %), тем не менее эффективность при простом внесении мутаций в ген *Mitf* в зиготах составила почти 100 %.

Нужно заметить, что при всех достоинствах использования системы CRISPR/Cas9 для модификации одноклеточных эмбрионов у этой технологии есть и свои подводные камни. Один из них – мозаицизм развивающегося животного, возникающий, когда мутагенез аллелей происходит независимо в разных бластомерах по мере развития эмбриона. Например, если CRISPR/Cas9 не успеет модифицировать ни одного аллеля на одноклеточной стадии, а на двуклеточной стадии мутирует участок генома только в одном из бластомеров, то лишь половина клеток родившегося животного будут нести мутации. Кроме того, если репарация по механизму NHEJ протекает с мутагенезом целевого локуса, то модификации, произошедшие в разных клетках, могут приводить к различающимся мутациям. В результате животное будет состоять из смеси клеток с несхожими мутациями в целевом локусе генома. Мозаицизм уже наблюдался в реальных экспериментах на мышах (Long et al., 2014; Yen et al., 2014). Однако наибольшее значение проблема мозаицизма приобретает в экспериментах на крупных животных. Если мозаицизм наблюдается в половых клетках, то приходится использовать длительную стратегию проведения скрещиваний, для того чтобы получить гомозиготных носителей мутации. Это, очевидно, становится очень большой проблемой с учетом длительных циклов размножения, характерных для крупных животных. Так, в единственной на сегодняшний день опубликованной работе по редактированию генома приматов родившиеся животные были мозаиками (Niu et al., 2014).

Применение CRISPR/Cas9 для генной терапии

В настоящее время CRISPR/Cas9 является самой используемой технологией для создания моделей заболеваний человека как *in vitro* – на разных типах стволовых клеток, так и *in vivo* – на генетически модифицированных животных.

Чрезвычайно высокая эффективность направленной модификации генов с помощью sgPНК и Cas9 позволяет одновременно редактировать сразу несколько копий гена: от биаллельных мутаций на гомологичных хромосомах (Wang et al., 2013a; González, Yeh, 2014) до мутагенеза 62 копий гена *pol* в эндогенных ретровирусах из генома свиньи (Yang et al., 2015). Последнее исследование имеет большое практическое значение, поскольку существуют опасения инфекции клеток человека этими ретровирусами при ксенотрансплантации органов от свиньи.

Для того чтобы упростить процесс моделирования заболеваний, в лаборатории пионера изучения CRISPR/Cas9 Фенга Жанга были получены трансгенные Cas9-мыши, во всех клетках которых экспрессируется Cas9 – либо конститутивно, либо после обработки Cre-рекомбиназой (Platt et al., 2014). Второй вариант позволяет ограничивать активность Cas9-нуклеазы специфичным типом клеток, так как проводятся скрещивания Cas9-мыши с линией, экспрессирующей Cre-рекомбиназу под тканеспецифическим промотором. Остается лишь ввести в клетки или зиготы Cas9-мыши sgPНК против гена-мишени.

Генная терапия для коррекции заболеваний человека – еще одна область медицины, где применение технологий направленного редактирования генома открывает широкие перспективы (Cox et al., 2015; Naldini, 2015). На модельных организмах была доказана принципиальная возможность коррекции мутации в одноклеточном эмбрионе. Работая с эмбрионами мышей, Y. Wu с коллегами (2013) показали, что доминантная мутация в гене *Crygc*, приводящая к катаракте, может быть исправлена путем ведения в зиготу мPНК Cas9 и соответствующей sgPНК. При этом аллель дикого типа (без мутации) на гомологичной хромосоме служит образцом для гомологичной рекомбинации. Мыши, родившиеся в результате этих экспериментов, не имели признаков катаракты, были фертильны и передавали аллель с исправленной мутацией потомкам. В другой работе (Long et al., 2014) авторы с помощью CRISPR/Cas9 редактировали мутацию в гене дистрофина (расположен на X-хромосоме), которая приводит к развитию мышечной дистрофии Дюшенна. В этом случае в зиготу мыши помимо мPНК Cas9 и sgPНК был введен короткий одноцепочечный ДНК-фрагмент (ssODN). Полученные мыши были мозаиками, по-видимому, из-за задержки в трансляции белка Cas9 на стадии зиготы. Но несмотря на этот факт, фенотип мышей был нормальным, что объясняется селективным преимуществом мышечных клеток с исправленной мутацией.

Описанные выше исследования были проведены исключительно на животной модели, однако авторы одной нашумевшей статьи (Liang et al., 2015) показали возможность редактирования генома в эмбрионах человека. В эксперименте были использованы три пронуклеарные зиготы, в которых исследователи модифицировали ген бета-глобина (Liang et al., 2015). Оказалось, что частота гомологичной рекомбинации в целевом локусе была низкой, а число off-target мутаций было существенно больше, чем в экспериментах с эмбрионами мышей или в культурах клеток человека. Интересно, что работа P. Liang с коллегами (2015) была отклонена ведущими журналами по этическим соображениям и вызвала бурные споры как

в научном сообществе, так и у общественности в целом (Cyranoski, 2015; Lanphier et al., 2015). Все же стало очевидно, что думать о практическом применении этой технологии на эмбрионах человека еще рано: необходимо решить много технических проблем, связанных с эффективностью и безопасностью CRISPR/Cas9. Естественно, что на первый план для современной генной терапии вышли методы редактирования генома в соматических клетках взрослого организма на основе CRISPR/Cas9.

Одна из первых работ по коррекции мутации непосредственно в тканях взрослого животного была проведена американской группой ученых на мышинной модели тирозинемии 1-го типа (Yin et al., 2014). Это заболевание связано с мутацией в гене фумарилацетоацетатгидролазы (*FAH*), которая приводит к нарушению метаболизма тирозина и в итоге к циррозу печени. Плазмидные векторы с компонентами системы CRISPR/Cas9 совместно с ДНК-олигонуклеотидом для гомологичной рекомбинации были введены в хвостовую вену мыши путем гидродинамической инъекции – в этом случае большая часть введенного раствора абсорбируется в печени. Исправление мутантного фенотипа происходило только в части клеток (0,4 %), но и этого было достаточно, так как такие клетки приобретали селективное преимущество и восстанавливали функцию печени.

В другой работе (Ding et al., 2014) мишенью стал ген пропротеиновой конвертазы (*Pcsk9*), играющей роль в гомеостазе холестерина. Известно, что при неактивном ферменте уровень холестерина в крови снижается, а, следовательно, снижается и риск коронарных заболеваний сердца. С помощью CRISPR/Cas9, упакованной в аденовирусные векторы, исследователи вносили мутации в ген *Pcsk9* в печени мыши. По их подсчетам, мутагенезу подвергалось до 50 % клеток печени, а уровень холестерина в крови при этом снижался на 35–40 %. Позднее была проведена похожая работа, но в качестве нуклеазы был использован ортолог Cas9, нуклеаза SaCas9, выделенная из бактерии *Staphylococcus aureus* (Ran et al., 2015). Ген *SaCas9* почти на 1000 п. н. меньше широко используемой нуклеазы *SpCas9*, поэтому он более эффективно упаковывается в аденовирусные частицы. Результаты этого исследования подтвердили эффективность терапии на основе SaCas9: более 40 % генно-модифицированных клеток, низкая неспецифическая активность и хорошая переносимость аденовирусных инфекций подопытными животными.

Большой прорыв сделан в генной терапии миодистрофии Дюшенна с помощью CRISPR/Cas9. Работы сразу трех научных коллективов были недавно опубликованы в одном номере журнала «Science» (Long et al., 2015; Nelson et al., 2015; Tabebordbar et al., 2015). Известно, что патология, как правило, вызывается мутациями, сдвигающими рамку считывания гена дистрофина (*dystrophin*), что приводит к отсутствию функционального белка. В таких случаях одна из потенциальных стратегий генной терапии – делеция экзона с мутацией с восстановлением рамки считывания гена. Образующийся при этом белок оказывается более коротким, но, тем не менее, функциональным. Исследователи вводили аденоассоциированные вирусы с компонентами системы CRISPR/Cas9 внутримышечно и внутривенно мышам с мутацией в гене дис-

трофина. В двух работах авторы (Long et al., 2015; Nelson et al., 2015) использовали нуклеазу SaCas9, а в третьей (Tabebordbar et al., 2015) – кодон-оптимизированный для человека вариант SpCas9. Результаты всех экспериментов одинаковы: индукция делеции мутантного участка восстанавливала экспрессию дистрофина в мышечных тканях, и подвижность животных увеличивалась. Более того, в предсказанных *in silico* off-target сайтах мутаций обнаружено не было.

Другой впечатляющий пример – это терапия пигментного ретинита. Исследование проводилось на модели пигментного ретинита крыс (S334ter-3), которая характеризуется доминантной мутацией в гене родопсина (*Rho*), приводящей к появлению стоп-кодона и укорочению белка на 15 аминокислот (Bakondi et al., 2015). Так как нуклеотидная замена вызывает возникновение РАМ-сайта (5'-TGG-3' вместо 5'-TGC-3'), стало возможным применить Cas9-индуцированный мутагенез для специфического «выключения» мутантного аллеля и частичного восстановления функции сетчатки. Интересным является то, что авторы воспользовались субретинальной инъекцией плазмид sgPНК/Cas9 с последующей электропорацией в глазах новорожденных крысят, которая оказалась эффективным методом доставки Cas9 *in vivo*.

Также в работе на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) от человека с нонсенс-мутацией в гене *RPGR* (нуклеотидная замена 3070G > T), вызывающей X-связанный пигментный ретинит, мутация была успешно исправлена с использованием короткой донорной ДНК-молекулы (ssODN) (Bassuk et al., 2016).

Описанные выше работы – примеры генной терапии, которая основана на внесении исправлений непосредственно в геном. Однако недавно ученые смогли провести эпигенетическую «подстройку» экспрессии участка генома человека. Каталитически неактивную dCas9, сшитую с транскрипционным репрессором KRAB, и sgPНК, использовали для того, чтобы изменить состояние хроматина и инактивировать D4Z4-микросателлитный повтор (Himeda et al., 2016). Аберрантная экспрессия PНК с этого района приводит к развитию одного из подтипов мышечной дистрофии – болезни Ландузи–Дежерина (*facioscapulohumeral muscular dystrophy*). Стоит сказать, что работа была проведена на культуре мышечных клеток, однако благодаря хорошим результатам можно ожидать, что она будет повторена в тестах *in vivo*.

Особый интерес представляет антивирусная терапия на основе программируемых нуклеаз. В природе CRISPR/Cas9 функционирует как система защиты бактерий от вирусной инфекции, так почему бы не применить эту защиту, прошедшую миллионы лет эволюции, для борьбы с вирусами человека? Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) в силу широкой распространенности и трудности полного излечения является наиболее подходящей мишенью. Существующая антиретровирусная терапия не позволяет избавиться от провирусов – копий вирусов, которые встроились в геном клетки. Н.-К. Liao с коллегами (2015) использовали систему CRISPR/Cas9, для того чтобы внести мутации в провирусную последовательность и снизить, таким образом, экспрессию вирусных генов. Протестировав ряд sgPНК на разные

участки вирусного генома, исследователи выяснили, что наибольшая эффективность (до 90 % резистентных к вирусу клеток) наблюдается при мутировании LTR-R региона вируса, регулирующего транскрипцию вирусной последовательности.

Параллельно развивается другая стратегия борьбы с ВИЧ – нарушение функции гена *CCR5*, кодирующего поверхностный рецептор на иммунных клетках человека. Известно, что при мутации этого гена вирус не способен проникнуть в клетку, что делает организм невосприимчивым к вирусной инфекции. Эффективность технологии CRISPR/Cas9 для получения мутаций в гене *CCR5* была показана на первичной культуре гемопоэтических стволовых клеток (Mandal et al., 2014) и на культуре индуцированных плюрипотентных клеток человека (Ye et al., 2014). Мутации в нецелевых сайтах при этом детектировались с низкой частотой. Подобные работы проводятся также и с другими системами редактирования генома (цинковопальцевые нуклеазы). В случае делеции *CCR5* с помощью цинковопальцевой нуклеазы даже проводится клиническое испытание, первые результаты которого свидетельствуют в пользу безопасности этого метода (Tebas et al., 2014). Все это говорит о большом потенциале технологий редактирования генома для генной терапии, по крайней мере в контексте заболеваний кроветворной системы.

Геномные скрининги на базе CRISPR/Cas9

Одним из преимуществ CRISPR/Cas9 является простота клонирования и создания библиотек sgРНК для масштабных генетических скринингов. Геномные скрининги помогают обнаружить множество новых генов, функционально ассоциированных с какими-либо биологическими функциями в клетке. Обычно используют два подхода: gain-of-function («включение» экспрессии генов кДНК-библиотекой) и loss-of-function («выключение» генов за счет РНК-интерференции). Если изменение уровня экспрессии гена влияет на исследуемый биологический процесс, такой ген-кандидат затем более детально изучается дополнительными молекулярно-генетическими способами. До появления в арсенале биологов методов на основе CRISPR/Cas9 геномные скрининги в основном проводились с помощью РНК-интерференции (RNAi) (Boutros, Ahringer, 2008). Система CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ по сравнению с RNAi. Во-первых, после негативной или позитивной селекции присутствие конкретных sgРНК в выживших клетках обнаруживают с помощью глубокого секвенирования, что позволяет однозначно выявить гены-мишени. Cas9 менее токсичен для клетки, а его активность зависит только от комплекса белков NHEJ, которые вызывают мутагенез генов при репарации разрывов. Напротив, процессинг РНК в RNAi зависит от многих глобальных клеточных процессов, которые поэтому не могут быть мишенью для скрининга. К тому же при сравнении сходных по целям генетических скринингов на основе RNAi и CRISPR/Cas9 последний демонстрирует более достоверные и воспроизводимые результаты (Shalem et al., 2015).

Генетические скрининги на основе CRISPR/Cas9 активно применяются в медицине. К настоящему моменту уже опубликовано более двух десятков работ, в которых

использовали геномные CRISPR/Cas9 скрининги для анализа различных биологических аспектов: канцерогенеза и метастазирования (Toledo et al., 2015), воспаления (Schmid-Burgk et al., 2016) или митохондриальных патологий (Jain et al., 2016). Подробную информацию о некоторых исследованиях можно найти в многочисленных обзорах (Shalem et al., 2015; Xue et al., 2016).

В области канцерогенеза примером может служить эксперимент из группы Фенга Жанга (Chen et al., 2015). Линию клеток немелкоклеточного рака легких мыши, не дающего в норме метастазов, обработали лентивирусом с Cas9 и библиотекой лентивирусов с sgРНК mGeCKO (67405 sgРНК против 20611 белок-кодирующих генов и 1175 микроРНК). После недели культивирования клеток *in vitro* большая часть sgРНК была равномерно представлена в клеточной популяции, за исключением sgРНК, вызывающих мутации в генах жизненно важных клеточных процессов, которые быстро терялись из популяции. После подкожной имплантации смеси клеток в реципиентную мышь образовалась опухоль, причем на этом этапе терялось более половины исходных sgРНК. Процесс селекции клеток с различными sgРНК в первичной опухоли был в основном случайным, что отражает низкое влияние мутагенеза на способность клеток выживать при имплантации. По мере роста опухоли в ней увеличивалось число мутантных клеток с преимуществом в выживании и скорости деления, с уменьшением представленности sgРНК (4 % от исходных). Наконец, при анализе метастазов, клетки которых проходят «бутылочное горлышко» при выселении из опухоли, наблюдалось совсем небольшое количество sgРНК (0,4 % от исходных). Это подтверждает клональную теорию образования метастазов. Несколько генов (*Nf2*, *Pten*, *Cdkn2a*, *Fga*), sgРНК против которых были чаще представлены в метастазах, ассоциированы с канцерогенезом и пролиферацией опухолей.

В другой работе группа американских ученых (Parnas et al., 2015) применила обсуждаемый подход в дендритных клетках из костного мозга мыши. Примечательно, что источником первичной культуры дендритных клеток послужила созданная ранее Cas9-экспрессирующая мышь (Platt et al., 2014). Авторы заразили клетки библиотекой лентивирусов из 125,793 sgРНК – это примерно шесть независимых sgРНК на каждый ген. Для проведения отбора мутантных фенотипов дендритные клетки обрабатывали липополисахаридами, имитирующими бактериальную инфекцию. Стимулированные клетки разделялись на клеточном сортере по уровню индукции экспрессии цитокина TNF-альфа (Tumor Necrosis Factor alpha), который отвечает за ранний ответ на липополисахариды. Были обнаружены десятки генов, в том числе и новых, как негативно, так и позитивно регулирующих TNF-альфа ассоциированный сигнальный каскад. Важным технологическим улучшением было применение дополнительного этапа валидации результатов для 2569 генов, обнаруженных в первичном скрининге. Для этого большое число клеток было заражено с покрытием в 10 sgРНК на ген из первичного списка и повторно проверено, что позволило повысить точность детекции.

Новые перспективы для генетических скринингов на основе CRISPR/Cas9 открываются по мере модификации

системы. К примеру, Cas9 может связывать и разрезать РНК-транскрипты (O'Connell et al., 2014), предоставляя платформу для высокопроцессивного нокдауна экспрессии генов. Присоединение к инактивированной Cas9 активаторных или репрессорных доменов различных белков также применяется для скринингов. S. Konermann с коллегами активировали гены в клетках меланомы, обработанных противоопухолевым агентом, ингибитором протоонкогена BRAF (вемурафенибом), и обнаружили гены, гиперэкспрессия которых ассоциирована с устойчивостью раковых клеток к этому препарату (Konermann et al., 2014). Многие из выявленных генов были известны врачам ранее – это в основном компоненты сигнальных путей (PI3K-АКТ, ERK и др.), компенсирующих ингибирование BRAF в раковых клетках. Было уже ясно, что их гиперэкспрессия коррелирует с плохим прогнозом при лечении вемурафенибом, однако скрининг обнаружил и множество новых генов-кандидатов. Для CRISPR/Cas9-скринингов будут полезны химерные белки на основе Cas9, несущие каталитически активные домены, как в случае с доменом ацетилтрансферазы, способной модифицировать гистоны (Hilton et al., 2015); а также присоединение к sgРНК длинных некодирующих РНК для выяснения их функций (Shechner et al., 2015). Важной задачей будет создание библиотек sgРНК и для некодирующих районов генома.

Снижение стоимости высокопроизводительных методов секвенирования (NGS) и открытое распространение sgРНК-библиотек для геномов различных организмов должны в скором времени сделать геномные скрининги на основе CRISPR/Cas9 доступными во многих лабораториях мира.

Применение CRISPR/Cas9 для внесения масштабных геномных мутаций (делеций, инверсий)

Использование универсального и эффективного метода геномного редактирования крайне необходимо и для получения хромосомных перестроек большого масштаба. Образование индел-мутаций (удаление–вставка нескольких нуклеотидов на месте репарационных событий) не всегда является достаточным условием для полной инактивации генетического элемента. Например, в случае с кластерами генов существуют множественные варианты транскриптов или же альтернативные старт-кодоны, расположенные в том же гене, способные при выпадении или вставке нескольких нуклеотидов исправить возникшую поломку; для нетранслируемых некодирующих молекул РНК или регуляторных последовательностей возникновение небольших мутаций не является серьезным препятствием для реализации их клеточной функции (Zhang et al., 2015). Таким образом, для функциональных исследований регуляторных и структурных элементов генома, генных кластеров, длинных некодирующих РНК (lncRNA), tandemно дублированных генов необходимы технологии, способные индуцировать направленные хромосомные перестройки в диапазоне от сотен до нескольких сотен тысяч п. н. Методы и системы клонирования, используемые прежде, например, ВАС (бактериальные искусственные хромосомы) и YAC (дрожжевые искусственные хромосо-

мы), довольно трудоемки в исполнении и, кроме того, не позволяют достичь желаемой эффективности.

CRISPR/Cas9 вызывает делецию, если вносит два одновременных разрыва в одном хромосомном локусе, при этом крупные хромосомные инверсии и дубликации при использовании Cas9 получаются спонтанно, с небольшой частотой. Одними из первых работ с применением CRISPR/Cas-системы, в которых удалось получить делеции и инверсии крупного масштаба, а также сравнить эффективность использования CRISPR/Cas9 и TALEN-систем, стали работы на геноме *Danio rerio* (Gupta et al., 2013; Gonzales et al., 2014; Ota et al., 2014). Были получены делеции гена микроРНК *dre-mir-126a* размером 563 п. н., а также кластера из шести генов – от *dre-mir-17a-2* до *dre-mir-92a-2* – величиной 1423 п. н. (Xiao et al., 2013). В другой работе была реализована возможность получения множественных геномных модификаций путем пронуклеарной инъекции мРНК нескольких направляющих в один локус РНК-молекул (sgРНК) и белка Cas9 в эмбрионы *Danio rerio* на 1–2-клеточной стадии (Ota et al., 2014). В результате были получены делеции до 7,1 тыс. п. н.

Затем последовало множество работ на различных модельных организмах, где при помощи CRISPR/Cas9 технологии удалось получить направленные перестройки крупного масштаба. На дрозофиле была проведена модификация локусов *rosy* и *yellow*, в результате чего были получены делеции размером 4,6 и 6,1 тыс. п. н. (Gratz et al., 2013). В экспериментах с CRISPR/Cas9 на эмбрионах аксолотля был получен нокаут по гену *Sox2* путем делеции геномного участка (Fei et al., 2014). Кроме того, система CRISPR/Cas9 оказалась применима и для удаления участков генома анаэробных грамм-положительных бактерий *Clostridium beijerinckii*, у которых практически отсутствует гомологичная рекомбинация, что затрудняло получение перестроек традиционными методами (Wang et al., 2015b). Совсем недавно была опубликована статья, в которой исследователи описали удаление фрагмента гена тирозиназы (*TYR*), связанного с альбинизмом, длиной 105 тыс. п. н. из генома кролика (Song et al., 2016). Доставка мРНК Cas9 и направляющих РНК-молекул осуществлялась пронуклеарной микроинъекцией в эмбрионы. В эксперименте наблюдалась достаточно высокая эффективность получения делеций: 10 % при ПЦП-скрининге эмбрионов и 18 % у рожденных крольчат.

Наиболее масштабные работы по получению делеций и инверсий с использованием CRISPR/Cas9-технологии проводились на клетках мыши и человека (Fujii et al., 2013; Li et al., 2013; Bauer et al., 2014; Canver et al., 2014; Choi et al., 2014; Essletzbichler et al., 2014; Fujihara et al., 2014; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2014; Brandl et al., 2015; He et al., 2015; Kraft et al., 2015; Zhang et al., 2015). Важной исследовательской задачей являются оптимизация процесса, достижение максимальной эффективности и скорости получения направленных геномных модификаций. Несколько крупных проектов были посвящены получению модельных животных для изучения патогенеза генетически обусловленных заболеваний, связанных с хромосомными aberrациями. В одной из работ на эту тему (Kraft et al., 2015) авторы представили подробный протокол получения трансгенных мышей с крупными

(до 1600 тыс. п. н.) структурными перестройками по геному с эффективностью до 42 %, названный CRISVar. Реализация предложенного протокола от момента дизайна специфических sgРНК-векторов до рождения химерных животных занимает 10 нед, что в несколько раз ускоряет процесс получения животных моделей по сравнению с 12 мес., затрачиваемыми ранее. Исследователям удалось детектировать делеции и инверсии для всех шести запланированных локусов (размеры делеций 1,2–1672 тыс. п. н. соответственно), тогда как процент возникновения дупликаций был в среднем в 1,5 раза ниже (Kraft et al., 2015).

Серьезной проблемой в данной области является то, что вероятность получения направленных геномных перестроек находится в определенной зависимости от размера последних. Причем выявление этой зависимости представляет предмет активных научных дискуссий (Xiao et al., 2013; Canver et al., 2014; He et al., 2015; Kraft et al., 2015; Song et al., 2016). Согласно данным из работы Kraft с коллегами (2015), взаимосвязь между размером модификации и частотой ее возникновения под действием CRISPR/Cas9-системы в эмбриональных стволовых клетках мыши отмечена не была. Но в исследовании, которое проводилось на линии клеток мышины эритролейкемии (MEL), авторы выявили обратную зависимость частоты возникновения перестройки от ее размера и предложили формулу функции нелинейной регрессии как наиболее подходящую для описания наблюдаемой корреляции (Canver et al., 2014). Помимо закономерности получения делеций, в данной работе была показана возможность удаления фрагментов ДНК размером от 1,3 до 1026 тыс. п. н. для локусов, расположенных в экзонах, интронах генов, а также в межгенных участках. Средняя эффективность процесса образования делеций составила 14,2 %, при этом фрагменты до 23 тыс. п. н. удалялись значительно лучше, тогда как последовательности свыше 70 тыс. – с эффективностью меньше 1 %. Частота образования инверсий составила 5,8 %, инверсии крупных размеров происходили со сниженной эффективностью. В одной из работ на линии НЕК293Т были получены свидетельства о независимости мутационного процесса с участием системы CRISPR/Cas9 от транскрипционного статуса выбранного района (Zheng et al., 2014). Авторы вносили делеции в ген цитокина *CCL2*, предварительно многократно усиливая его экспрессию добавлением фактора TNF-альфа, действующего на экспрессию *CCL2* через NF-κB сигнальный путь. Активность гена выросла примерно в 300 раз, при этом эффективность геномных перестроек осталась сравнительно неизменной, в среднем диапазоне 16–28 % (Zheng et al., 2014).

Получение крупных делеций имеет ценность и для некоторых медицинских исследований, нацеленных на исправление дефектных последовательностей генов при моногенных заболеваниях. Выше мы уже упоминали подходы, применяемые для восстановления рамки считывания гена дистрофина при миодистрофии Дюшенна за счет удаления мутантных экзонов. Известно, что более 60 % мутаций в гене дистрофина, приводящие к развитию миодистрофии Дюшенна, происходят между 45 и 55-м экзонам. В многочисленных исследованиях, в том числе и с использованием системы CRISPR/Cas9, показано,

что делеция этого района дистрофина, имеющего размер около 725 тыс. п. н., приводит к образованию укороченного, но функционального белка. Преимущество этой универсальной стратегии в том, что делеция большого участка гена применима для лечения множества пациентов с миодистрофией Дюшенна и требует тестирования и использования лишь одной пары sgРНК (Ousterout et al., 2015; Young et al., 2016).

Как было отмечено в начале раздела, одна из задач, решить которую стало возможно благодаря появлению CRISPR/Cas технологии, – это исследование функции и роли длинных некодирующих РНК. Накапливается все больше информации о вовлеченности таких РНК-молекул во многие клеточные процессы, в числе которых и их участие в регуляции геномной транскрипции (Nagano et al., 2011). Точности существующих генно-инженерных методов оказалось недостаточно для направленного удаления протяженных нуклеотидных последовательностей некодирующих РНК, так как последние могут иметь множественные альтернативные варианты. Классические способы модификации генома с привлечением гомологичной рекомбинации в случае крупных перестроек неудобны и малоэффективны. CRISPR/Cas9-система позволяет решить эту проблему, что было продемонстрировано в работе с lncРНК *Rian*, у которой есть многочисленные альтернативные формы (Han et al., 2014). Инъекция *in vitro* транскрибированные мРНК Cas9 и sgРНК в одноклеточные эмбрионы, исследователям удалось получить делеции в *Rian*-локусе размером до 23 тыс. п. н. при использовании пары направляющих РНК-молекул, а также повысить эффективность этого процесса до 33 % при участии нескольких sgРНК. Удаление кодирующей последовательности *Rian* привело к полному исчезновению ее экспрессии с материнского аллеля, а также к изменению экспрессии близлежащих генов в различных тканях.

В заключение стоит отметить, что делеции и инверсии при использовании CRISPR/Cas9 получаются на удивление легко и с высокой частотой. Так что не стоит забывать, что они могут произойти и случайно при одновременной доставке в клетки множества sgRNA для других целей (Niu et al., 2014; Frock et al., 2015).

CRISPR/Cas9 как основа создания искусственных генов драйверов

Высокая эффективность системы CRISPR/Cas9 открыла новые возможности для контроля численности популяции насекомых-переносчиков заболеваний человека. Для этого было предложено внедрять в природные популяции насекомых-переносчиков, таких как малярийные комары, искусственные генетические элементы, инсерция которых приводит к нокауту определенных генов. Такие элементы (геновые драйверы) способны конвертировать сопутствующий нормальный аллель и копировать себя, поэтому они быстро распространяются в популяции (рис. 3), даже если их наличие в геноме приводит к уменьшению приспособленности особи (Unckless et al., 2015). Идея использования искусственного автономного генетического элемента на основе программируемой нуклеазы была высказана более 10 лет назад (Burt, 2003), однако полноценная реализация данного подхода стала возможной

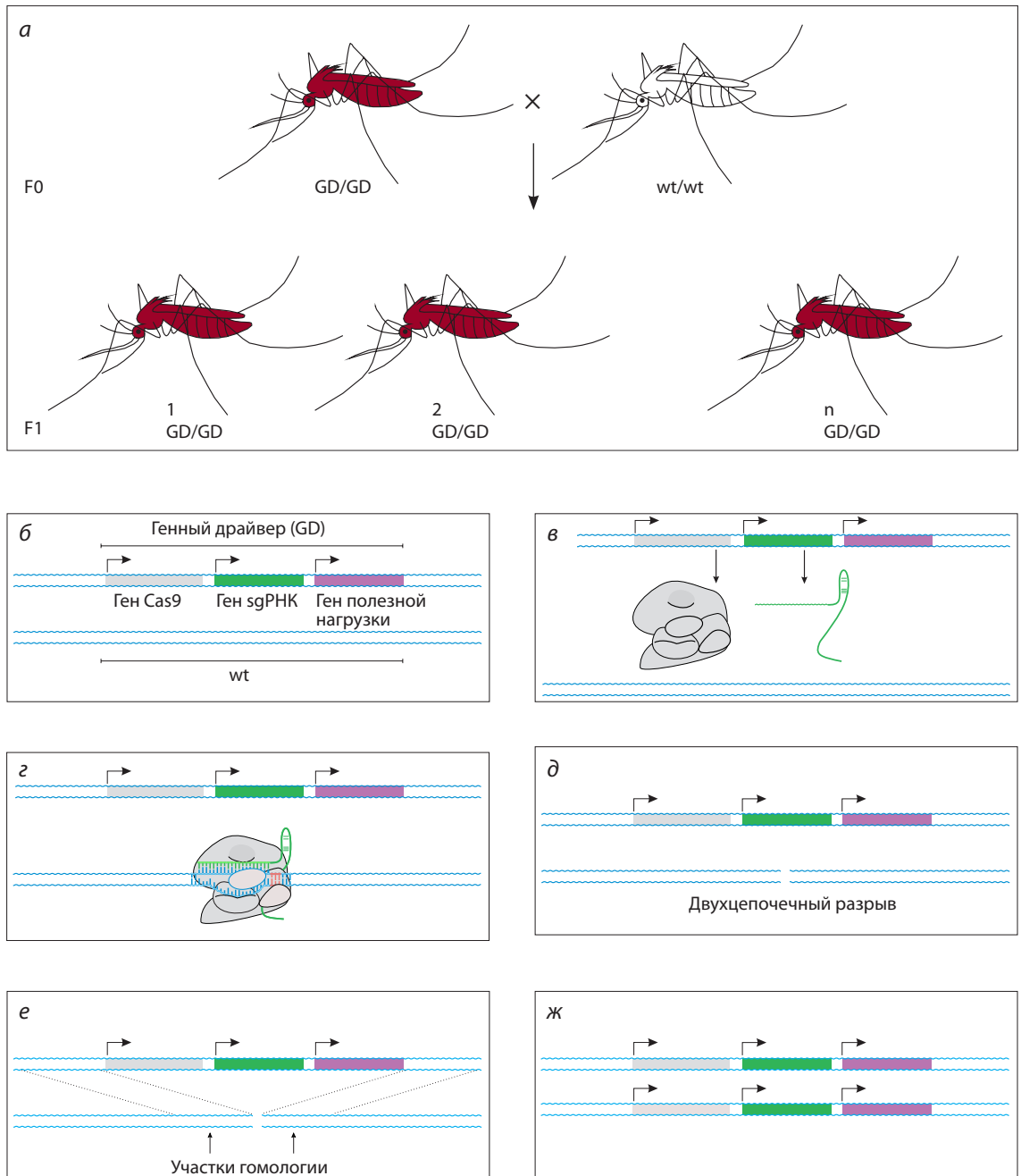


Рис. 3. Генные драйверы на основе CRISPR/Cas9.

а – схема наследования генного драйвера (GD); б–ж – копирование генного драйвера в аллель дикого типа (wt): б – схема генного драйвера; в – в клетке нарабатываются белок Cas9 и sgРНК; г – комплекс Cas9-sgРНК связывается с аллелем дикого типа; д – Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в аллель дикого типа; е – двухцепочечный разрыв репарируется системой гомологичной репарации по матрице хромосомы, содержащей генный драйвер; ж – в результате репарации появляется клетка, гомозиготная по генному драйверу.

только после создания простой и эффективной системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Проверка принципа предложенной идеи была проведена на дрозофиле (Gantz, Vier, 2015). С помощью традиционного способа получения трансгенных мух – микроинъекции генетической конструкции в оплодотворенное яйцо – были получены мухи, у которых в геномный локус *yellow* (*y*) была введена генетическая конструкция, состоящая из трех основных

элементов. Это, во-первых, кодирующая часть белка Cas9 под контролем промотора, обеспечивающего активность гена и в соматических, и в герминальных клетках; во-вторых, sgРНК, комплементарная выбранному участку гена *yellow*. Наконец, фланкировали конструкцию плечи гомологии – протяженные последовательности, гомологичные участкам справа и слева от вносимого разрыва в гене *y*. Поскольку интеграция конструкции приводит

к нокауту по гену *u*, наследование конструкции можно проследить по фенотипу мух. При скрещивании мух, гомозиготных по наличию трансгена (*y-/y-*), с мухами дикого типа (*y+/y+*) ожидается, что все потомки будут гетерозиготами по трансгену (*y+/y-*), однако в данном случае классические законы Менделя (Mendel, 1865) нарушаются, так что практически все (97 %) потомки имели фенотип *y-/y-* и были гомозиготами по трансгену. Особенность наследования этой конструкции объясняется тем, что на самых ранних стадиях развития за счет активности Cas9 и sgPHK, унаследованных в составе трансгенной конструкции от одного из родителей, вносится двухцепочечный разрыв в локус *y+*, унаследованный от второго родителя. Далее разрыв репарируется по механизму гомологичной рекомбинации, причем в качестве матрицы используется локус, несущий трансген, так как он фланкирован последовательностями, гомологичными району разрыва. При этом происходит копирование трансгенной конструкции в нормальный аллель. Следовательно, конструкции такого типа наследуются не только вертикально, от родителя к потомкам, но и горизонтально, в ядре клетки от трансгенного локуса в локус дикого типа (Gantz, Bier, 2015).

Применение этой технологии было опробовано на двух видах комаров *Anopheles stephensi* (Gantz, Bier, 2015) и *Anopheles gambiae* (Hammond et al., 2015). В обеих работах была продемонстрирована высокая эффективность наследования трансгенной конструкции. Однако дизайн экспериментов несколько отличался. V.M. Gantz с коллегами (2015), помимо элементов, обеспечивающих интеграцию (Cas9, sgPHK и плечи гомологии), ввели в конструкцию два гена одноцепочечных антител против антигенов возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. Такая конструкция, будучи введенной в нейтральный локус генома, не будет сказываться на приспособленности комара, но сделает его неспособным к передаче малярийного плазмодия. Хотя такая стратегия кажется привлекательной, поскольку мало влияет на комаров как вид, она, возможно, окажется не столь эффективной в борьбе с распространением малярии, поскольку может вызвать быструю эволюцию антигенов плазмодия, в результате которой они станут нечувствительными к используемым антителам (Alphey, 2016). A. Hammond с коллегами (2015) тоже предлагают использовать Cas9-подход для уменьшения численности популяции малярийных комаров. Для этого трансгенную конструкцию вводят в гены, нокаут по которым в гомозиготном состоянии приводит к стерильности самок. Моделирование распространения этого элемента в популяции показало, что доля его носителей может увеличиться с 0,05 до 0,9 менее, чем за два года. При этом доля фертильных самок станет меньше 20 % и далее продолжит уменьшаться вплоть до полного уничтожения популяции (Burt, 2003; Deredec et al., 2008). Вопросы безопасности применения таких крайне инвазивных конструкций, потенциально способных уничтожить биологический вид, безусловно, должны быть детально проанализированы до принятия решения об их использовании. Поэтому уже сейчас разрабатываются подходы для контроля распространения в популяции генетических драйверов на основе Cas9 (Wu et al., 2016).

Подробное обсуждение технологии генетических драйверов можно найти в недавнем обзоре группы американских ученых (Champer et al., 2016).

Заключение

Появление системы CRISPR/Cas9 в арсенале геномной инженерии оказало огромное влияние на биологию. С 2013 г., когда были опубликованы первые свидетельства о «программируемости» Cas9 для редактирования генома, систему CRISPR/Cas9 начали использовать в тысячах лабораторий по всему миру (по данным сайта Addgene). Редакции многих уважаемых журналов (например, «Science» и «Nature»), называют это не менее чем Cas9-помешательством (Cas9 «craze» и «frenzy»). Мы предлагаем обзор наиболее важных, на наш взгляд, областей биологии, в которых система CRISPR/Cas9 оказалась особенно востребована. Среди них, конечно, генная терапия, хромосомная инженерия и геномные скрининги, а также создание трансгенных животных. К сожалению, в рамках обзора мы не смогли подробно обсудить использование CRISPR/Cas9 для активации и репрессии экспрессии генов, эпигенетической модификации состояния хроматина и флуоресцентного мечения специфических участков хромосом. Не упомянуты также создание трансгенных животных-биопродукторов и многое другое, включая и совсем отдаленные перспективы – воскрешение вымерших видов животных (странствующего голубя или мамонта) – на основе геномов современных видов. В ближайшем будущем можно ожидать идентификации новых уникальных ДНК и РНК-редактирующих нуклеаз среди тысяч белков из CRISPR/Cas-систем.

Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект 16-14-00095).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Alphey L. Can CRISPR-Cas9 gene drives curb malaria? Nat. Biotechnol. 2016;34(2):149-150.
- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. Nature. 2014;513(7519):569-573.
- Bakondi B., Lv W., Lu B., Jones M.K., Tsai Y., Kim K.J., Levy R., Akhtar A.A., Breunig J.J., Svendsen C.N., Wang S. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther. 2015;24(3):556-563.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science (N.Y.). 2007; 315(5819):1709-1712.
- Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.L. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. Cell Rep. 2013;4(1):220-228.
- Bassuk A.G., Zheng A., Li Y., Tsang S.H., Mahajan V.B. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells. Sci. Rep. 2016;6:19969.
- Bauer D.E., Canver M.C., Orkin S.H. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. J. Vis. Exp. 2014;83:e52118.

- Bolukbasi M.F., Gupta A., Wolfe S.A. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nat. Methods*. 2016; 13(1):37-40.
- Boutros M., Ahringer J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 2008;9(7):554-566.
- Brandl C., Ortiz O., Rottig B., Wefers B., Wurst W., Kuhn R. Creation of targeted genomic deletions using TALEN or CRISPR/Cas nuclease pairs in one-cell mouse embryos. *FEBS Open Bio*. 2015;5:26-35.
- Burt A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 2003;270(1518):921-928.
- Canver M.C., Bauer D.E., Dass A., Yien Y.Y., Chung J., Masuda T., Maeda T., Paw B.H., Orkin S.H. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/cas9 nuclease system in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2014;289(31):21312-21324.
- Champer J., Buchman A., Akbari O.S. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17(3):146-159.
- Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., Huang B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. 2013;155(7):1479-1491.
- Chen S., Sanjana N.E., Zheng K., Shalem O., Lee K., Shi X., Scott D.A., Song J., Pan J.Q., Weissleder R., Lee H., Zhang F., Sharp P.A. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*. 2015;160(6):1246-1260.
- Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L., Katz Y., Theunissen T.W., Rangarajan S., Shivalila C.S., Dadon D.B., Jaenisch R. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. 2013;23(10):1163-1171.
- Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.-S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 2014;24(1):132-141.
- Choi P.S., Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat. Commun.* 2014;5:3728.
- Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):543-548.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823.
- Costello M.J., May R.M., Stork N.E. Can we name Earth's species before they go extinct? *Science*. 2013;339(6118):413-416.
- Cox D.B.T., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* 2015;21(2):121-131.
- Crispo M., Mulet A.P., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., dos Santos-Neto P.C., Nguyen T.H., Crénéguy A., Brusselle L., Anegón I., Menchaca A. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0136690.
- Cyranoski D. Embryo editing divides scientists. *Nature*. 2015;519(7543):272.
- Davis K.M., Pattanayak V., Thompson D.B., Zuris J.A., Liu D.R. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* 2015;11(5):316-318.
- Deredec A., Burt A., Godfray H.C.J. The population genetics of using homing endonuclease genes in vector and pest management. *Genetics*. 2008;179(4):2013-2026.
- Dianov G.L., Hübscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(6):3483-3490.
- Ding Q., Strong A., Patel K.M., Ng S.L., Gosis B.S., Regan S.N., Cowan C.A., Rader D.J., Musunuru K. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* 2014;115(5):488-492.
- Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):184-191.
- Elliott B., Richardson C., Winderbaum J., Nickoloff J.A., Jasin M. Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(1):93-101.
- Essletzbichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M.B., Bürckstümmer T. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*. 2014;24(12):2059-2065.
- Fei J.F., Schuez M., Tazaki A., Taniguchi Y., Roensch K., Tanaka E.M. CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem Cell Reports*. 2014;3(3):444-459.
- Findlay G.M., Boyle E.A., Hause R.J., Klein J.C., Shendure J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature*. 2014;513(7516):120-123.
- Flowers J.J., He S., Malfatti S., del Rio T.G., Tringe S.G., Hugenholtz P., McMahon K.D. Comparative genomics of two "Candidatus Accumulibacter" clades performing biological phosphorus removal. *ISME J*. 2013;7(12):2301-2314.
- Frock R.L., Hu J., Meyers R.M., Ho Y.-J., Kii E., Alt F.W. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(2):179-186.
- Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):822-826.
- Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(3):279-284.
- Fujihara Y., Ikawa M. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. *Method. Enzymol.* 2014;546:319-336.
- Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K., Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(20):e187.
- Gantz V.M., Bier E. The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*. 2015; 348(6233):442-444.
- Gantz V.M., Jasinskiene N., Tatarenkova O., Fazekas A., Macias V.M., Bier E., James A.A. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2015;112(49):E6736-E6743.
- Geisinger J.M., Turan S., Hernandez S., Spector L.P., Calos M.P. In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. *Nucl. Acids Res.* 2016;44(8):e76.
- Gonzales A.P.W., Yeh J.R. Cas9-based genome editing in Zebrafish. *Methods Enzymol.* 2014;546:377-413.
- González F., Zhu Z., Shi Z.-D., Lelli K., Verma N., Li Q.V., Huangfu D. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):215-226.
- Graham D.B., Root D.E. Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome Biol.* 2015;16(1):260.
- Gratz S.J., Wildonger J., Harrison M.M., O'Connor-Giles K.M. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Fly*. 2013;7(4):37-41.
- Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):577-582.
- Gupta A., Hall V.L., Kok F.O., Shin M., McNulty J.C., Lawson N.D., Wolfe S.A. Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. *Genome Res*. 2013;23(6):1008-1017.
- Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A.,

- Windbichler N., Crisanti A., Nolan T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* 2015;34(1):1-8.
- Han J., Zhang J., Chen L., Shen B., Zhou J., Hu B., Du Y., Tate P.H., Huang X., Zhang W. Efficient in vivo deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biology.* 2014;11(7):829-835.
- He Z., Proudfoot C., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C.B.A., Lillo S.G. Highly efficient targeted chromosome deletions using CRISPR/Cas9. *Biotechnol. Bioeng.* 2015;112(5):1060-1064.
- Hendel A., Bak R.O., Clark J.T., Kennedy A.B., Ryan D.E., Roy S., Steinfeld I., Lunstad B.D., Kaiser R.J., Wilkens A.B., Bacchetta R., Tsalenko A., Dellinger D., Bruhn L., Porteus M.H. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(9):985-989.
- Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E., Reddy T.E., Gersbach C.A. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):510-517.
- Himeda C.L., Jones T.I., Jones P.L. CRISPR/dCas9-mediated transcriptional inhibition ameliorates the epigenetic dysregulation at D4Z4 and represses DUX4-fl in FSH muscular dystrophy. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 2016;24(3):527-535.
- Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L.-F., Sontheimer E.J., Thomson J.A. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013;110(39):15644-15649.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):827-832.
- Hu X., Chang N., Wang X., Zhou F., Zhou X., Zhu X., Xiong J.-W. Heritable gene-targeting with gRNA/Cas9 in rats. *Cell Res.* 2013;23(11):1322-1325.
- Jain I.H., Zazzaron L., Goli R., Alexa K., Schatzman-Bone S., Dhillon H., Goldberger O., Peng J., Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F., Goessling W., Zapot W.M., Mootha V.K. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science.* 2016;352(6281):54-61.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-821.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science.* 2014;343(6176):1247997.
- Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529(7587):490-495.
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* 2014;517(7536):583-588.
- Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragesteen B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupianez D.G., Andrey G. Deletions, inversions, duplications: Engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Reports.* 2015;10(5):833-839.
- Kuscu C., Arslan S., Singh R., Thorpe J., Adli M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(7):677-683.
- Lanphier E., Urnov F.D., Ehlen S.H., Werner M., Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature.* 2015;519:410-411.
- Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., Zhao Y., Liu M. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(8):681-683.
- Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triplozygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363-372.
- Liao H.-K., Gu Y., Diaz A., Marlett J., Takahashi Y., Li M., Suzuki K., Xu R., Hishida T., Chang C.-J., Esteban C.R., Young J., Izpisua Belmonte J.C. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat. Commun.* 2015;6:6413.
- Lin Y., Cradick T.J., Brown M.T., Deshmukh H., Ranjan P., Sarode N., Wile B.M., Vertino P.M., Stewart F.J., Bao G. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 2014;42(11):7473-7485.
- Liu X., Homma A., Sayadi J., Yang S., Ohashi J., Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Reports.* 2016;6:19675.
- Long C., Amoasii L., Mireault A.A., McAnally J.R., Li H., Sanchez-Ortiz E., Bhattacharyya S., Shelton J.M., Bassel-Duby R., Olson E.N. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science.* 2015;351(6271):400-403.
- Long C., McAnally J.R., Shelton J.M., Mireault A.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014;345(6201):1184-1188.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E. V An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13(11):722-736.
- Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):833-838.
- Malina A., Cameron C.J.F., Robert F., Blanchette M., Dostie J., Pelletier J. PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. *Nat. Commun.* 2015;6:10124.
- Mandal P.K., Ferreira L.M.R., Collins R., Meissner T.B., Boutwell C.L., Friesen M., Vrbancac V., Garrison B.S., Storchveoi A., Bryder D., Musunuru K., Brand H., Tager A.M., Allen T.M., Talkowski M.E., Rossi D.J., Cowan C.A. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell.* 2014;15(5):643-652.
- Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):538-542.
- Mendel G. Experiments in plant hybridization. *J. Roy. Hort. Soc.* 1865;IV(1865):3-47.
- Mora C., Tittensor D.P., Adl S., Simpson A.G.B., Worm B. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 2011;9(8):e1001127.
- Nagano T., Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell.* 2011;145(2):178-181.
- Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature.* 2015;526(7573):351-360.
- Nelson C.E., Gersbach C.A. Cas9 loosens its grip on off-target sites. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(3):298-299.
- Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G., Thakore P.I., Moreb E.A., Rivera R.M.C., Madhavan S., Pan X., Ran F.A., Yan W.X., Asokan A., Zhang F., Duan D., Gersbach C.A. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2015;351(6271):403-407.
- Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A., Chen C. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e106718.

- Nishimasu H., Cong L., Yan W.X., Ran F.A., Zetsche B., Li Y., Kura-bayashi A., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*. 2015;162(5):1113-1126.
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949.
- Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A.P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014;156(4): 836-843.
- O'Connell M.R., Oakes B.L., Sternberg S.H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J.A. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*. 2014;516(7530):263-266.
- Ota S., Hisano Y., Ikawa Y., Kawahara A. Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes to Cells*. 2014;19(7):555-564.
- Ousterout D.G., Kabadi A.M., Thakore P.I., Majoros W.H., Reddy T.E., Gersbach C.A. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2015;6:6244.
- Parnas O., Jovanovic M., Eisenhaure T.M., Herbst R.H., Dixit A., Ye C.J., Przybylski D., Platt R.J., Tirosch I., Sanjana N.E., Shalem O., Satija R., Raychowdhury R., Mertins P., Carr S.A., Zhang F., Hacohen N., Regev A. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell*. 2015;162(3):675-686.
- Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9):839-843.
- Peng J., Wang Y., Jiang J., Zhou X., Song L., Wang L., Ding C., Qin J., Liu L., Wang W., Liu J., Huang X., Wei H., Zhang P. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Sci. Reports*. 2015;5:16705.
- Pinder J., Salsman J., Dellaire G. Nuclear domain "knock-in" screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucl. Acids Res.* 2015;43(19): 9379-9392.
- Platt R.J., Chen S., Zhou Y., Yim M.J., Swiech L., Kempton H.R., Dahlman J.E., Parnas O., Eisenhaure T.M., Jovanovic M., Graham D.B., Jhunjhunwala S., Heidenreich M., Xavier R.J., Langer R., Anderson D.G., Hacohen N., Regev A., Feng G., Sharp P.A., Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*. 2014;159(2):440-455.
- Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186-191.
- Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.-Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380-1389.
- Robert F., Barbeau M., Éthier S., Dostie J., Pelletier J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Gen. Med.* 2015;7(1):93.
- Schmid-Burgk J.L., Chauhan D., Schmidt T., Ebert T.S., Reinhardt J., Endl E., Hornung V. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) screen identifies NEK7 as an essential component of NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(1):103-109.
- Semenova E., Jore M.M., Datsenko K.A., Semenova A., Westra E.R., Wanner B., van der Oost J., Brouns S.J., Severinov K. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011;108(25):10098-10103.
- Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 2015;16(5):299-311.
- Shechner D.M., Hacisuleyman E., Younger S.T., Rinn J.L. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. *Nat. Methods*. 2015;12(7):664-670.
- Slymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2015;351(6268):84-88.
- Song Y., Yuan L., Wang Y., Chen M., Deng J., Lv Q., Sui T., Li Z., Lai L. Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;1:1-10.
- Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-67.
- Tabebordbar M., Zhu K., Cheng J.K.W., Chew W.L., Widrick J.J., Yan W.X., Maesner C., Wu E.Y., Xiao R., Ran F.A., Cong L., Zhang F., Vandenberghe L.H., Church G.M., Wagers A.J., Vandenberghe H., Church G.M., Wagers A.J. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2015;351(6271):407-411.
- Tan W., Proudfoot C., Lillico S.G., Whitelaw C.B.A. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res.* 2016;25(3): 273-287.
- Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L.S., Weissman J.S., Vale R.D. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*. 2014;159(3):635-646.
- Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., Spratt S.K., Surosky R.T., Giedlin M.A., Nichol G., Holmes M.C., Gregory P.D., Ando D.G., Kalos M., Collman R.G., Binder-Scholl G., Plesa G., Hwang W.-T., Levine B.L., June C.H. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New Engl. J. Med.* 2014;370(10):901-910.
- Toledo C.M., Ding Y., Hoellerbauer P., Davis R.J., Basom R., Girard E.J., Lee E., Corrin P., Hart T., Bolouri H., Davison J., Zhang Q., Hardcastle J., Aronow B.J., Plaisier C.L., Baliga N.S., Moffat J., Lin Q., Li X.-N., Nam D.-H., Lee J., Pollard S.M., Zhu J., Delrow J.J., Clurman B.E., Olson J.M., Paddison P.J. Genome-wide CRISPR-Cas9 screens reveal loss of redundancy between PKMYT1 and WEE1 in glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Reports*. 2015;13(11):2425-2439.
- Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung J.K. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):569-576.
- Unckless R.L., Messer P.W., Connallon T., Clark A.G. Modeling the manipulation of natural populations by the mutagenic chain reaction. *Genetics*. 2015;201(2):425-431.
- Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-918.
- Wang X., Zhou J., Cao C., Huang J., Hai T., Wang Y., Zheng Q., Zhang H., Qin G., Miao X., Wang H., Cao S., Zhou Q., Zhao J. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs. *Sci. Reports*. 2015a;5:13348.
- Wang Y., Zhang Z.T., Seo S.O., Choi K., Lu T., Jin Y.S., Blaschek H.P. Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. *J. Biotechnol.* 2015b;200:1-5.
- Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D., Prather R.S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol. Reprod.* 2014;91(3):78.
- Wiedenheft B., Lander G.C., Zhou K., Jore M.M., Brouns S.J., van der Oost J., Doudna J.A., Nogales E. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*. 2011; 477(7365):486-489.

- Wijshake T., Baker D.J., van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1842(10): 1942-1950.
- Wright A.V., Nunez J.K., Doudna J.A. Review biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 2016;164(1-2):29-44.
- Wright A.V., Sternberg S.H., Taylor D.W., Staahl B.T., Bardales J.A., Kornfeld J.E., Doudna J.A. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015;112(10):2984-2989.
- Wu B., Luo L., Gao X.J. Cas9-triggered chain ablation of cas9 as a gene drive brake. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):137-138.
- Wu X., Scott D.A., Kriz A.J., Chiu A.C., Hsu P.D., Dadon D.B., Cheng A.W., Trevino A.E., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp P.A. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(7):670-676.
- Wu Y., Liang D., Wang Y., Bai M., Tang W., Bao S., Yan Z., Li D., Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):659-662.
- Wyvekens N., Topkar V.V., Khayter C., Joung J.K., Tsai S.Q. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Hum. Gene Ther.* 2015; 26(7):425-431.
- Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z., Yang Z., Zu Y., Li W., Huang P., Tong X., Zhu Z., Lin S., Zhang B. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(14):1-11.
- Xue H.Y., Ji L.J., Gao A.M., Liu P., He J.D., Lu X.J. CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives. *J. Med. Genet.* 2016;53(2):91-97.
- Yang D., Scavuzzo M.A., Chmielowiec J., Sharp R., Bajic A., Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci. Reports.* 2016;6:21264.
- Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013a;154(6): 1370-1379.
- Yang L., Grishin D., Wang G., Aach J., Zhang C.-Z., Chari R., Homzy J., Cai X., Zhao Y., Fan J.-B., Seidman C., Seidman J., Pu W., Church G. Targeted and genome-wide sequencing reveal single nucleotide variations impacting specificity of Cas9 in human stem cells. *Nat. Commun.* 2014;5:5507.
- Yang L., Guell M., Byrne S., Yang J.L., De Los Angeles A., Mali P., Aach J., Kim-Kiselak C., Briggs A.W., Rios X., Huang P.Y., Daley G., Church G. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucl. Acids Res.* 2013b;41(19):9049-9061.
- Yang L., Guell M., Niu D., George H., Lesho E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkinson R.A., Fishman J.A., Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015;350(6264):1101-1104.
- Ye L., Wang J., Beyer A.I., Teque F., Cradick T.J., Qi Z., Chang J.C., Bao G., Muench M.O., Yu J., Levy J.A., Kan Y.W. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014;111(26):9591-9596.
- Yen S.T., Zhang M., Deng J.M., Usman S.J., Smith C.N., Parker-Thornburg J., Swinton P.G., Martin J.F., Behringer R.R. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev. Biol.* 2014;393(1):3-9.
- Yin H., Xue W., Chen S., Bogorad R.L., Benedetti E., Grompe M., Kotliansky V., Sharp P.A., Jacks T., Anderson D.G. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):551-553.
- Young C.S., Hicks M.R., Ermolova N.V., Nakano H., Jan M., Younesi S., Karumbayaram S., Kumagai-Cresse C., Wang D., Zack J.A., Kohn D.B., Nakano A., Nelson S.F., Miceli M.C., Spencer M.J., Pyle A.D. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell.* 2016;18(4):533-540.
- Yu C., Liu Y., Ma T., Liu K., Xu S., Zhang Y., Liu H., La Russa M., Xie M., Ding S., Qi L.S. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2015;16(2): 142-147.
- Yuan L., Sui T., Chen M., Deng J., Huang Y., Zeng J., Lv Q., Song Y., Li Z., Lai L. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci. Reports.* 2016;6: 22024.
- Zalatan J.G., Lee M.E., Almeida R., Gilbert L.A., Whitehead E.H., La Russa M., Tsai J.C., Weissman J.S., Dueber J.E., Qi L.S., Lim W.A. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell.* 2014;160(1-2):339-350.
- Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015a;163(3): 759-771.
- Zetsche B., Volz S.E., Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* 2015b;33(2):139-142.
- Zhang L., Jia R., Palange N.J., Satheka A.C., Togo J., An Y., Humphrey M., Ban L., Ji Y., Jin H., Feng X., Zheng Y. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE.* 2015;10(3):1-14.
- Zheng Q., Cai X., Tan M.H., Schaffert S., Arnold C.P., Gong X., Chen C.Z., Huang S. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *BioTechniques.* 2014; 57(3):115-124.
- Zhou J., Wang J., Shen B., Chen L., Su Y., Yang J., Zhang W., Tian X., Huang X. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS J.* 2014;281(7):1717-1725.



Перспективные возможности использования молекулярно-генетических подходов для управления технологическими свойствами зерна пшеницы в контексте цепочки «зерно – мука – хлеб»

Е.К. Хлесткина^{1,2}✉, Т.А. Пшеничникова¹, Н.И. Усенко², Ю.С. Отмахова^{2,3}

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 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт экономики и организации промышленного производства Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

В рамках данной обзорной статьи рассмотрены возможности молекулярно-генетических подходов к управлению технологическими свойствами зерна пшеницы, влияющими на качество готовой продукции хлебопекарного производства. В настоящее время при росте производства зерна происходит вымывание традиционного ассортимента, ухудшается качество хлеба массовых сортов, в хлебопечении в виде улучшителей применяются десятки различных веществ биологического и химического происхождения. Между тем генетический потенциал пшеницы позволяет создавать сорта для производства зерна с технологическими характеристиками, пригодными для производства высококачественного хлеба. В истории отечественной селекции имеются множественные примеры создания сортов для получения зерна 1-го и 2-го класса, а современная молекулярная генетика предлагает подходы, которые при комбинировании с традиционными методами селекции делают возможным ускоренное создание новых адаптированных к условиям и требованиям хлебопекарной отрасли сортов за счет использования естественного генетического потенциала пшеницы. Авторами обобщены данные по разнообразию требований, предъявляемых к зерну и муке различного конечного пищевого использования. Проанализированы статистические данные по объемам и структуре качества зерна в России в период 2011–2014 гг. Выявлена существенная деформация структуры качества производимого зерна пшеницы в пользу менее ценных классов. Проведен краткий ретроспективный анализ исследований в области генетики пшеницы, показавших роль генетических факторов в формировании технологических свойств зерна и муки. Рассмотрены различные подходы для ускоренной селекции сортов с заданными свойствами в перспективе развития исследований в области молекулярной генетики растений. Приведены примеры, иллюстрирующие возможность и целесообразность использования методов ДНК-диагностики на разных этапах процесса, в ходе которого реализуется и сказывается на качестве конечного продукта заложенный в генофонде продовольственных культур генетический потенциал. Рассмотрены результаты молекулярно-генетических исследований по определению локализации и структуры генов, вовлеченных в формирование технологических свойств зерна пшеницы: содержание белка и сырой клейковины, мукомольные свойства, реологические свойства муки и теста, цвет муки, свойства крахмала. Суммированы данные о диагностических ДНК-маркерах, подходящих для эффективного отбора генотипов взамен трудоемкого анализа технологических характеристик на промежуточных

Prospective applications of molecular genetic approaches to control technological properties of wheat grain in the context of the “grain – flour – bread” chain

E.K. Khlestkina^{1,2}✉, T.A. Pshenichnikova¹, N.I. Usenko², Yu.S. Otmakhova^{2,3}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Economics and Industrial Engineering SB RAS, Novosibirsk, Russia

In this review, the opportunities of molecular genetic approaches for the management of technological properties of wheat grain affecting the quality of the end product of bread industry are considered. Currently, along with the growth of grain production, the traditional assortment is crowded out, the quality of mass bread varieties deteriorates, dozens of different substances of biological and chemical origin are used as bread improvers. Meanwhile, the genetic potential of wheat allows for the creation of varieties with technological characteristics of grain that are suitable for the production of high quality bread. In wheat breeding in Russia, multiple examples of the creation of varieties for the production of 1st and 2nd class grain are known, and modern molecular genetics offers approaches that can assist classical breeding approaches to accelerate the development of new varieties adapted to the conditions and requirements of the baking industry, based on the natural genetic potential of wheat. This review summarizes the diversity of requirements for grain and flour for different end-use food. Statistics on the volume and structure of the grain quality in Russia in 2011–2014 is analyzed. An essential deformation of quality structure of the produced wheat grain in favor of the less valuable classes is observed. A brief retrospective analysis of research in the field of wheat genetics, demonstrating genetic bases of technological properties is performed. Various approaches for rapid selection of varieties with desired properties are considered in relation to the development of research in the field of plant molecular genetics. Examples illustrating the feasibility of using the methods of DNA

УДК 577.21:633.11

Поступила в редакцию 03.12.2015 г.

Принята к публикации 27.01.2016 г.

Опубликована онлайн 03.02.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

✉ e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

этапах селекции. Таким образом, в обобщенном виде представлена информация о генетическом потенциале мягкой пшеницы и современных технологических подходах, которые составляют основу для смены направления от повышенной химизации в сторону более мягкого и органичного влияния на качество основного сырья и продукции во всей продовольственной цепочке «зерно – мука – хлеб».

Ключевые слова: мягкая пшеница; продовольственная безопасность; зерно; содержание клейковины; мукомольные свойства; мука; физические свойства теста; хлебопекарная промышленность; гены; ДНК-маркеры; геномная селекция; маркер-ориентированная селекция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хлесткина Е.К., Пшеничникова Т.А., Усенко Н.И., Отмахова Ю.С. Перспективные возможности использования молекулярно-генетических подходов для управления технологическими свойствами зерна пшеницы в контексте цепочки «зерно – мука – хлеб». Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):511-527. DOI 10.18699/VJ15.140

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Usenko N.I., Otmakhova Yu.S. Prospective applications of molecular genetic approaches to control technological properties of wheat grain in the context of the “grain – flour – bread” chain. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):511-527. DOI 10.18699/VJ15.140

diagnostics at various stages of the process, during which the genetic potential of food crops is realized and affects the quality of the final product. The results of molecular genetic studies on the localization and isolation of genes determining technological properties (protein and crude gluten contents, milling properties, rheological properties, flour color, starch properties) are reviewed. The data on diagnostic DNA markers, which are suitable for efficient selection of genotypes instead of time-consuming analysis of technological properties during the breeding process, are summarized. Thus, information about the genetic potential of bread wheat and the modern technologies, which together provide a basis for changing from increased application of chemicals to a more benign and organic effect on the quality of the products throughout the “grain – flour – bread” chain, is summarized.

Key words: bread wheat; food security; grain; gluten content; milling properties; flour; physical properties of the dough; baking industry; genes; DNA-markers; genomic selection; marker-assisted selection.

Производство зерна пшеницы исторически является основной функционирования национального агропродовольственного комплекса и носит системобразующий характер для других отраслей экономики, в частности для хлебопекарной отрасли. Однако на рынке хлеба наблюдаются тенденции ухудшения качества хлебопекарной продукции¹, при том что формирование продовольственной цепочки: «зерно – мука – хлеб» предполагает использование отечественного продовольственного сырья, в достаточном количестве производимого в России. Несмотря на определенную волатильность годовых показателей валового сбора пшеницы (озимой и яровой) в Российской Федерации, имеет место их выраженной поступательная динамика: в 2000 г. этот показатель, согласно данным Росстата, был равен 34,5 млн т, в 2010 г. – 41,5 млн т, в 2014 г. – 59,7 млн т (с учетом данных по Крымскому федеральному округу). При этом Россия является одним из ведущих экспортеров продовольственного зерна в мире. На протяжении прошлого сельскохозяйственного года (с начала июля 2014 г. по конец июня 2015 г.) величина экспорта составила 22 млн т пшеницы, что является абсолютным рекордом со времени присутствия России на внешних рынках (Производство пшеницы..., 2015).

Почему при росте производства зерна пшеницы ухудшается качество хлеба? В чем причины сложившегося положения и какие могут быть направления выхода из сложившейся ситуации?

Поиск решения этих задач находится в различных плоскостях: как в научной сфере, так и в области практики. Но независимо от специфики конкретных областей исследований, с нашей точки зрения, они должны рассматриваться в контексте продовольственной цепочки «зерно – мука – хлеб», связывая ее начальные и конечные стадии (Усенко, Сафьянов, 1996; Усенко, Сердюкова, 2005; Сердюкова, 2012). Качество хлеба как завершающий этап цепочки должно быть главным критерием эффективности рассматриваемой продовольственной цепочки.

Многие десятилетия исследований в области генетики пшеницы показали, что в основе различий по хлебопекарному качеству лежит генетическое разнообразие, заложенное в сортах. Известны и продолжают выявляться и изучаться гены, которые влияют на технологические свойства зерна и физические свойства теста (см. Международный каталог генных символов пшеницы (McIntosh et al., 2015)). Созданы и продолжают создаваться отечественные сорта, отличающиеся высокими показателями по этим признакам (наиболее яркие примеры – озимые сорта мягкой пшеницы Безостая 1 и Мироновская 808 и яровые Саратовская 29 и Новосибирская 67). Кроме того, сегодня молекулярная генетика предлагает широкий набор подходов, сопутствующих традиционной селекции и позволяющих в разы ускорить процесс получения новых сортов с заданными свойствами за счет ДНК-диагностики растений, отбираемых в процессе селекции (см. обзоры (Moose, Mumm, 2008; Khlestkina, 2014)).

Сорта с технологическими характеристиками, необходимыми для получения зерна 1-го и 2-го класса, являются основой для перехода от активного применения

¹ В 2015 г. ФБУ Красноярский центр стандартизации, метрологии и испытаний провел экспертизу самых покупаемых сортов хлеба, по результатам которой с дегустации было снято 40 % образцов. Только в категории хлеба из пшеничной муки первого сорта с дегустации были сняты пять образцов из десяти (<http://kachestvo.ru/news/uhudshilos-kachestvo-hleba.html>).

улучшителей в сторону использования природного генетического потенциала пшеницы для управления качеством основного сырья и продукции во всей продовольственной цепочке «зерно–мука–хлеб» в соответствии с принципами продовольственной безопасности и требованиями к повышению качества питания населения.

Влияние изменений качественных характеристик зерна на качество и технологические особенности производства хлеба

Известно, что качество хлеба зависит от хлебопекарных свойств муки, определяемых качественными характеристиками зерна. Широко используемый термин «качество зерна» обобщенно характеризует конечное технологическое назначение зерна пшеницы. Оно обуславливается свойствами эндосперма зерновки, его биохимическим составом и структурой. Эндосперм – запасающий орган семени, обеспечивающий при прорастании питание зародыша, образуется на завершающем этапе онтогенеза растения пшеницы. Как и все остальные этапы, процесс образования эндосперма строго контролируется со стороны генома. Это значит, что все последующие свойства эндосперма зерновки, определяющие его технологические характеристики, также генетически обусловлены.

Качество зерна – это комплексный признак, состоящий из многих отдельных параметров, каждый из которых характеризует технологические свойства зерна и его конечное назначение. Основными при оценке выращенного зерна являются содержание клейковины, а также ее качество. Среди них – мукомольные свойства, такие как масса 1000 зерен, натура зерна, твердозерность, определяемая структурой эндосперма зерна. Содержание белка и клейковины в зерне определяет его биологическую полноценность и пищевое достоинство, а также формирует уникальную для пшеницы хлебопекарную способность. Клейковина может быть слабой, средней или сильной. Это ее свойство, в свою очередь, тесно связано с реологическими свойствами теста, полученного из муки, выработанной из определенного зерна. Все эти признаки очень важны в связи с высоким уровнем автоматизированности мукомольных предприятий и хлебозаводов и пекарен. Наряду с высокими мукомольными свойствами, характеризующимися большим содержанием эндосперма и его легкой вымалываемостью, также важно, чтобы из муки получалось тесто, сохраняющее при механической обработке хорошие физические свойства и позволяющее выпекать высококачественный хлеб (Пумпянский, 1971). В табл. 1 представлено разнообразие требований, предъявляемых к зерну и муке различного конечного пищевого использования.

Таким образом, для различных видов мучных изделий требуется зерно с различной твердостью эндосперма, содержанием белка от 10 до 14 % и с контрастным типом клейковины. Условия выращивания пшеницы, а также условия созревания, уборки и хранения существенно влияют на весь комплекс признаков качества зерна, однако при этом именно генотип сорта пшеницы потенциально может обеспечить разнообразие по технологическим свойствам зерна. Этот вывод принципиально важен в условиях трансформации структуры качества российского зерна

в сторону увеличения доли зерна с более низкими качественными показателями. Стоит отметить, что тенденция снижения объема предлагаемой высококачественной пшеницы отмечается и на мировом рынке, международные трейдеры выказывают особую обеспокоенность качественными показателями пшеницы в ряде крупнейших стран-производителей (Мировой рынок зерна..., 2014).

За организацию мониторинга информации о товарных и потребительских свойствах российского зерна отвечает Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. Для этого используется механизм ежегодного конкурсного отбора организаций на право проведения данных работ. Представленные результаты обследований структуры качества зерна, проводимых в 2011–2014 гг. (<http://government.ru/orders/12150/>; <http://www.fczerma.ru/News.aspx>; <http://www.mcx.ru/news/news/show/27614.htm>), суммированы в табл. 2 и 3 для мягкой и твердой пшеницы соответственно.

В обследованных регионах объемы зерна как твердой, так и мягкой пшеницы составили в среднем около 50 % от валового сбора по соответствующему виду. Анализ приведенных данных показал, что доля зерна продовольственной пшеницы мягкой варьировалась за рассматриваемый период с 73,5 % в 2011 г. до 79,9 % в 2012 г. (табл. 2), а твердой пшеницы – с 82,4 в 2013 г. до 87,2 % в 2012 г. (табл. 3).

В структуре качества продовольственного зерна стоит отметить такие неблагоприятные тенденции, как увеличение доли менее ценных сортов пшеницы. В 2013 г. доля зерна пшеницы твердой 4-го класса составила 54,4 %, что на 6,2 процентных пункта больше, чем в 2011 г. и на 12,9 процентных пункта больше, чем в 2012 г. (см. табл. 3). Удельный вес зерна пшеницы мягкой 4-го класса в 2014 г. составил 47,6 %, что также выше показателей предыдущих лет (см. табл. 2). Соответственно уменьшились показатели удельного веса зерна 3-го класса: в 2013 г. это значение для зерна пшеницы твердой составило 27,3 %, а для зерна пшеницы мягкой в 2014 г. – 29,8 % (см. табл. 2 и 3). Самые низкие значения в структуре качества зерна приходится на ценные сорта 1-го и 2-го класса. Особенно это касается мягкой пшеницы, зерно 1-го и 2-го класса которой практически не производится, что наглядно представлено на рис. 1.

Как показали результаты анализа финансово-экономических данных крупных и средних предприятий в Сибирском регионе на протяжении последних десяти лет (Сердюкова, 2004; Усенко, Сердюкова, 2005; Serdyukova, Usenko, 2013), оптимизация затрат на хлебопекарных предприятиях в условиях резкого сокращения на российском рынке доли зерна с высокими хлебопекарными свойствами происходит, в основном, за счет приобретения муки низкой ценовой категории с низкими показателями качества. Такой подход неизбежно приводит к ухудшению качества производимой продукции.

Необходимо отметить, что в рамках одного ГОСТа на муку можно приобрести сырье по разным ценам от различных поставщиков с отличающимися показателями качества. Наряду с соблюдением «гостовских» требований ряд показателей муки (и, что важно, показатель уровня клейковины) может значительно варьироваться, что суще-

Таблица 1. Характеристики качества зерна для различных типов изделий из муки, по (Рефа, 2002)

Тип	Твердозерность	Содержание белка, %	Тип клейковины
Дрожжевые хлеба			
Формовой хлеб, сдобные изделия	Твердый эндосперм	> 13	Сильная, упругая
Подовые изделия, багеты	Твердый эндосперм/среднетвердозерный	11–14	Среднерастяжимая
Паровые изделия	Твердый/мягкий	11–13	Средняя/слабая
Бездрожжевые (плоские) хлеба			
Арабский	Твердый эндосперм/среднетвердозерный	12–14	Среднерастяжимая
Чапати, тортилла	Среднетвердозерный	11–13	Среднерастяжимая
Крекеры	Среднетвердозерный/мягкий эндосперм	11–13	Средняя
Лапша			
Желтая	Среднетвердозерный	11–13	Средняя/сильная
Белая	Среднетвердозерный/мягкий эндосперм	10–12	Средняя
Печенье, торты, другие кондитерские изделия			
Обобщенные данные	Мягкий/очень мягкий эндосперм	8–10	Слабая/слаборастяжимая

Таблица 2. Структура качества зерна мягкой пшеницы в 2011–2014 гг.

Год	Объем обследованного зерна в регионах, млн т (%)*	Выявлено пшеницы продовольственной, млн т (%)**	Распределение пшеницы продовольственной по классам, %				Непродовольственная пшеница 5-го класса, млн т (%)**
			1-й	2-й	3-й	4-й	
2011	Нет данных	24,1 (73,5)	0,08	0,9	35,8	36,7	8,6 (26,3)
2012	20,0 (54,5)	15,9 (79,9)	0,004	0,04	49,8	30,1	4,0 (20,1)
2013	26,6 (52,7)	20,3 (76,5)	Нет	0,001	38,7	37,7	6,3 (23,5)
2014	12,5 (42,1)	9,6 (77,5)	Нет	0,04	29,8	47,6	2,8 (22,5)

* Доля от фактического валового сбора в обследованных регионах Российской Федерации; ** доля от объема обследования.

Таблица 3. Структура качества зерна твердой пшеницы в 2011–2013 гг.

Год	Объем обследованного зерна в регионах, тыс. т (%)*	Выявлено пшеницы продовольственной, тыс. т (%)**	Распределение пшеницы продовольственной по классам, %				Непродовольственная пшеница 5-го класса, тыс. т (%)**
			1-й	2-й	3-й	4-й	
2011	Нет данных	266,1 (84,7)	4,2	0,5	31,8	48,2	45,8 (14,6)
2012	119,6 (54,9)	104,2 (87,2)	1,7	Нет	44,0	41,5	15,4 (12,9)
2013	249,2 (52,4)	205,4 (82,4)	0,2	0,55	27,3	54,4	43,7 (17,6)

* Доля от фактического валового сбора в обследованных регионах Российской Федерации; ** доля от объема обследования.

ственным образом отражается на ухудшении потребительских свойств хлеба. Если доля клейковины в муке низкая, то такой хлеб имеет меньший объем, низкую эластичность и крошится. Повышенный уровень крошимости хлеба – на сегодня один из серьезных параметров ухудшения потребительских свойств хлеба (Дефекты хлеба, 2015).

В условиях падающего качества зерна для нивелирования снижения хлебопекарных свойств муки на хлебопекарных предприятиях все шире используют современные ингредиенты, корректирующие качество муки: это

комплексные и модульные хлебопекарные улучшители направленного действия; маргарины и смеси для приготовления хлеба².

Согласно ГОСТ Р 51785-01, хлебопекарный улучшитель – это пищевая добавка (или смесь пищевых добавок), улучшающая свойства теста и качество хлебобулочных

² В настоящее время хлебопекарные ингредиенты предлагают более 20 зарубежных компаний. В России их производят в основном мировые концерны, имеющие представительства и производства на российской территории, такие как IREKS, PURATOS, LESAFFRE.

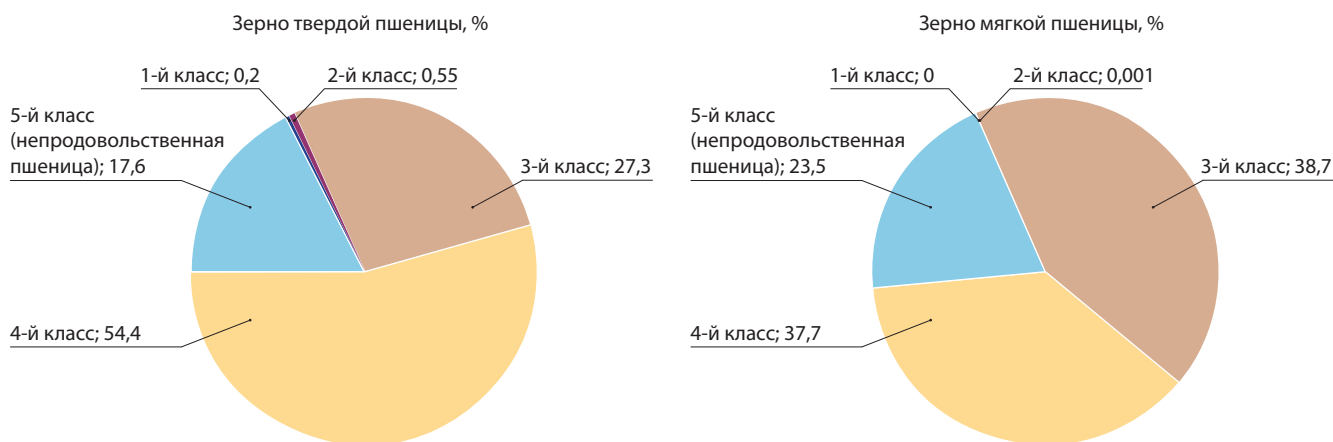


Рис. 1. Структура качества зерна твердой и мягкой пшеницы в Российской Федерации в 2013 г.

изделий. Комплексный хлебопекарный улучшитель – это взаимосвязанная и сбалансированная комбинация различных компонентов (различной природы и принципа действия), которая может включать: окислители, ферменты, эмульгаторы, восстановители, компоненты со специальным эффектом, например добавки против плесневения и заболевания картофельной болезнью, а также наполнители – крахмал, соевую муку, сахар, искусственные подсластители, сухую клейковину и др.

Таким образом, в современном хлебопечении в качестве улучшителей используют несколько десятков различных веществ как биологического, так и химического происхождения. Активное применение пищевых добавок как корректоров свойств муки расширило возможности предприятий в использовании муки ненадлежащего качества, а также в определенной мере позволило решить вопросы повышения технологичности хлебопекарного производства. Так, можно продлить на значительное время сроки хранения хлеба и расширить географию сбыта; качество исходной муки становится не таким значимым фактором при внесении соответствующих добавок и улучшителей, а вкусоароматические добавки дают возможность разнообразить ассортимент выпускаемой продукции (Serdyukova, Usenko, 2013).

Однако, наряду с положительным влиянием пищевых добавок, есть и обратная сторона их влияния на здоровье человека. Многие из них, как правило, не имеют пищевого значения и в лучшем случае биологически инертны, а в худшем оказываются биологически активны и небезразличны для организма. Так, в практической деятельности мукомольных предприятий применяют агрессивные химические вещества, например, для отбеливания муки используют пероксид бензоила (E928) (Позняковский и др., 2011).

Новые рецептуры меняют вкус хлеба, меняется структура мякиша. Новые сорта хлебобулочной продукции по составу продукта зачастую находятся между классическим хлебом, содержащим минимальное жиров, и сдобными булочными изделиями, именуясь при этом хлебом. Так, модульная добавка Софтр Интенс Фреш, в состав которой входят E471 и ферменты амилаза и ксиланаза, может быть

добавлена к любой рецептуре хлеба и не требует внесения дополнительной информации на этикетке. Пищевая добавка E471 обозначает ряд моно- и диглицеридов жирных кислот (искусственных жиров), считается безвредной и усваивается, как любые другие жиры. Однако за счет присутствия эмульгатора значительно повышена жирность и калорийность продуктов (Позняковский и др., 2011).

Полагаем, что увеличение содержания жира в хлебобулочной продукции меняет ее вклад в пирамиду питания. Если традиционный хлеб, содержащий полезные вещества в структуре, благоприятной для поддержания жизнедеятельности и здоровья человека (достаточно много белков (4,7–8,3 %), мало жиров (0,6–1,3 %), значительное количество углеводов (40–56 %), минеральные соединения и пищевые волокна), находится на нижнем (базовом) этаже пирамиды (Позняковский и др., 2004), то зачастую его современные сорта с применением улучшителей по содержанию жиров уже можно отнести на этаж выше. И это неблагоприятная тенденция, поскольку в структуре рациона питания населения Российской Федерации наблюдается увеличение доли жира относительно его рациональной нормы.

Согласно данным Росстата (Выборочное наблюдение рациона питания населения. Федеральная служба государственной статистики, 2013), в общей калорийности рациона питания населения фактическая структура потребления белков, жиров и углеводов выглядит следующим образом: 13,6 : 38,7 : 47,9 (для сравнения: пропорции сбалансированного пищевого рациона: 15 : 30 : 55; Челнакова, Позняковский, 2015). Применение хлебопекарных улучшителей и переход в соответствии с этим на ускоренные технологии производства хлеба приводит к тому, что население может получать нездоровую хлебную продукцию, существенно отличающуюся по своим свойствам от традиционного хлеба.

Как показано, существенным фактором, вызывающим рост процессов химизации в хлебопечении, является недостаток на российском рынке зерна пшеницы 1-го и 2-го класса. Одним из факторов для уменьшения диспропорций в структуре качества зерна является возможность

использования естественного генетического потенциала пшеницы в процессе селекции сортов со свойствами, отвечающими современным технологическим требованиям хлебопекарного производства, что позволит избежать массивного применения химически синтезированных пищевых добавок в производстве хлеба и будет содействовать обеспечению населения качественной продукцией с высокой пищевой ценностью.

Роль генетических факторов в формировании технологических свойств зерна и муки

Технологические свойства зерна были одними из первых признаков, которые в начале XX в., после переоткрытия законов Менделя, стали изучать путем гибридизации. Была установлена применимость этих законов к наследованию хлебопекарных и мукомольных качеств. Так, Biffen (1908) впервые показал, что мягкозерность эндосперма пшеницы, связанная с указанными признаками, контролируется одним геном, который лишь спустя более чем 50 лет был локализован в хромосоме 5D. В 1930–1940-е гг. были инициированы генетические исследования физических свойств клейковины. Уже тогда стало ясно, что признак контролируется несколькими генами (Worzella, 1934, 1942).

В нашей стране целенаправленные исследования в области генетики качества зерна как комплексного признака начались в середине 1960-х гг. Ольгой Ивановной Майстренко в Институте цитологии и генетики СО АН СССР. Путем исследования гибридов между сортами с различным качеством клейковины была показана вероятность появления ценных по данному признаку генотипов на определенных этапах отбора (Майстренко, Трошина, 1966). В этой же работе сообщалось, что качество клейковины определяется небольшим (3–4) количеством генов, следовательно, этим свойством можно управлять при создании новых сортов пшеницы. Дальнейшие работы 1970–1980-х гг., основанные на манипуляции с отдельными хромосомами генома пшеницы, подтвердили этот вывод. Было обнаружено, что отсутствие некоторых хромосом или хромосомных плеч приводит к значительным изменениям отдельных технологических свойств зерна и муки. Например, отсутствие одной дозы хромосомы 1D у высококачественного сорта Саратовская 29 (С29) приводит к резкому ухудшению физических свойств муки и теста (Arbuzova et al., 2001). Утеря короткого плеча хромосомы 4В у низкокачественного сорта Чайниз Спринг, наоборот, приводит к увеличению силы муки (Maystrenko et al., 1973). Межсортовое замещение хромосомы 1А низкокачественного сорта Диамант 2 (с дефектным вариантом гена, синтезирующего один из белков клейковины) на хромосому от высококачественного сорта Новосибирская 67 приводит к увеличению силы муки (Пшеничникова и др., 2006). Подобное замещение хромосомы 4D мягкой пшеницы «сильного» сорта С29 на гомологичную от сорта Янецкис Пробат с более низкой силой муки приводит к снижению этого технологического свойства (Ermakova et al., 2008).

В 1980–1990-е гг. широко изучался аллелизм по отдельным компонентным белкам клейковины (глиадином и глютеинам) и его связь с отдельными физическими

параметрами муки и теста. Было показано, что определенные варианты глютеина действительно существенно влияют на силу муки и упругость теста (Cornish et al., 2006). Гены, кодирующие такие варианты глютеина, широко используют при создании новых сортов.

Таким образом, результаты многолетних исследований показали, что разнообразие по технологическим свойствам зерна и муки может быть обеспечено генетически в сортах пшеницы, так как все биохимические компоненты клейковины образуются при созревании зерновки. Для некоторых технологических характеристик выявлены контролирующие гены и описаны их разные варианты (McIntosh et al., 2015). Например, разнообразие по мукомольным признакам определяется разными вариантами генов, кодирующих белки-пуриноидины (хромосома 5D). Вязко эластичные свойства клейковины в значительной степени определяются ее белковым составом – компонентным составом многочисленных белков глиадинов и глютеинов. Их гены находятся в хромосомах гомеологических групп 1 и 6 (McIntosh et al., 2015).

Тем не менее выявленные гены, контролирующие биосинтез отдельных структурных элементов клейковины, не объясняли всего генетического разнообразия пшеницы по технологическим свойствам зерна и муки. Это неудивительно с учетом сложности и разнообразия физиологических процессов, происходящих при формировании эндосперма зерновки. Необходимо было изучить генетический контроль регуляции этих процессов, который носит количественный характер, а также их место и роль в жизненном цикле растения. Только с появлением современных молекулярно-генетических технологий стало возможным определение конкретных участков генома (локусов), которые вносят вклад в количественные признаки. К настоящему моменту в геноме пшеницы выявлены многочисленные локусы, влияющие на отдельные технологические параметры зерна (Balyan et al., 2013; McIntosh et al., 2015). Накопление этих данных и развитие методов анализа ДНК позволило создать новые инструменты для повышения эффективности отбора нужных форм в процессе селекции и ускорения создания сортов с заданными свойствами, а также для решения ряда других вопросов, возникающих на всех этапах процесса (предселекционные исследования – селекция – регистрация сорта – семеноводство – производство зерна – производство муки – конечный продукт), в ходе которого реализуется и сказывается на качестве конечного продукта заложенный в генофонде продовольственных культур генетический потенциал.

Молекулярная генетика и геномика: эффективное управление и идентификация генов в сортах, семенах и пищевых продуктах

В 1983 г. было впервые предложено использование ДНК-маркеров в селекции растений (Beckmann, Soller, 1983; Burr et al., 1983; Tanksley, 1983), и сегодня уже трудно представить селекционный процесс без использования методов современной генетики и геномики. Классические подходы селекции, основанные на скрещивании и отборе растений, комбинируют с современными методами оценки селекционного материала на уровне ДНК (ДНК-

генотипирование). За счет этого сочетания возможно ускоренное создание новых улучшенных сортов на основе существующего генетического разнообразия.

ДНК-генотипирование активно используют в крупных международных селекционных центрах (William et al., 2007; Xu, Crouch, 2008; Brumlop, Finckh, 2011). В последние годы данные подходы также внедряются и в селекционных институтах России и стран СНГ (Vespalova et al., 2012; Урбанович и др., 2013; Давоян и др., 2014; Кильчевский и др., 2014). Программы по селекции пшеницы с использованием методов ДНК-генотипирования интенсивно реализуются в странах – крупнейших производителей зерна, в частности в Канаде и Австралии (Eagles et al., 2001; Randhawa et al., 2013). Преимущества селекции растений с использованием ДНК-генотипирования были, в первую очередь, по достоинству оценены и распространены в программах, нацеленных на повышение устойчивости к фитопатогенам (рис. 2). Современные методы генетики и геномики также активно используют в селекции на продуктивность, качество и устойчивость к различным факторам абиотического стресса (см. рис. 2).

Методы ДНК-генотипирования для ускоренного создания сортов с заданными свойствами. За три десятилетия методы ДНК-генотипирования существенно трансформировались: появились простые в использовании подходы и автоматизированные процессы, что и привело к широкому внедрению в селекционную практику. Даже первые подходы в 1980-е гг., основанные на использовании RFLP-анализа, дорогостоящего и трудоемкого по сравнению с современными методами генотипирования, показали экономическую выгоду от использования ДНК-технологий в селекции (Beckmann, Soller, 1983; Burr et al., 1983; Tanksley, 1983). Позже с появлением более дешевого и несложного метода анализа ДНК – полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Saiki et al., 1985) был разработан широкий спектр подходов для диагностики генотипа, основанный на использовании этого метода.

ДНК-генотипирование позволяет выявлять различия между разными биологическими образцами в определенных участках генома – «маркировать» геном, его участки или конкретные гены. Поэтому появился термин «маркер», а сочетание этого термина с различными подходами дало начало обозначениям: RFLP-маркер, ПЦР-маркер (частные случаи ПЦР-маркеров – RAPD-маркеры, SSR-маркеры, AFLP-маркеры и др.; см. обзоры (Хлесткина, Салина, 2006; Khlestkina, 2012)). Сочетание ДНК-генотипирования с классическими подходами селекции, основанными на скрещивании и отборе, стало называться маркер-ориентированной селекцией (МОС); синонимы: маркер-вспомогательная селекция; маркер-ассоциированная селекция; маркер-опосредованная селекция, отбор с помощью маркеров, маркерный отбор, маркер-контролируемый отбор; маркерная селекция, молекулярная селекция (англ. – marker-assisted selection; marker-aided selection; marker-assisted breeding).

Для того чтобы отслеживать перенос определенного гена в процессе реализации МОС, необязательно знать первичную структуру ДНК гена, и это существенно, так как среди возделываемых растений немногие имеют полностью секвенированный геном. Достаточно знать



Рис. 2. Интенсивность использования ДНК-генотипирования для решения различных задач селекции растений (доля, в %, от опубликованных работ 1995–2009 гг.), согласно оценке Brumlop, Finckh (2011).

расположение гена на хромосоме и близлежащие ДНК-маркеры, желателно фланкирующие ген с обеих сторон. С помощью таких маркеров можно отслеживать передачу потомству конкретного участка генома от определенной родительской формы – донора полезного признака. Точность отбора весьма высока и зависит от близости расположения маркера. Например, при использовании пары маркеров, расположенных по разные стороны от гена на расстоянии 5 сМ каждый, можно добиться точности отбора потомков по этому гену на уровне примерно 99,5 %.

Накопление данных о структуре хозяйственно-ценных генов возделываемых растений и выявление изменений в ДНК, связанных с функциональными вариантами генов, позволяет разрабатывать внутригенные маркеры; их называют функциональными. Использование внутригенных маркеров дает возможность добиться 100 %-й точности при отборе нужных генотипов. Функциональные маркеры еще только начинают разрабатываться (интенсивность их разработки зависит от степени изученности генома и развития генетических исследований у того или иного вида растений) и перспективны для селекции (Liu et al., 2012; Lau et al., 2015).

С помощью внутригенных или сцепленных с геном диагностических маркеров можно переносить полезные гены от доноров в элитные сорта (реципиенты). Для этого используют схемы маркер-контролируемого беккроссирования, наиболее популярного подхода в МОС-программах (рис. 3). В них помимо маркеров, диагностических для целевого гена, часто используют маркеры, равномерно распределенные по геному. Это делается для ускоренного восстановления генома реципиента (элитного сорта). Такой подход позволяет завершить процесс беккроссирования на несколько поколений раньше (Moose, Mumm, 2008; Khlestkina, 2014).

С помощью ДНК-генотипирования можно не только ускорять и удешевлять селекционный процесс, но и создавать сорта с комбинацией генов, которые крайне трудно получить путем отбора растений только по внешним признакам (фенотипу). Например, ДНК-генотипирование облегчает процесс создания пирамид генов (метод «gene

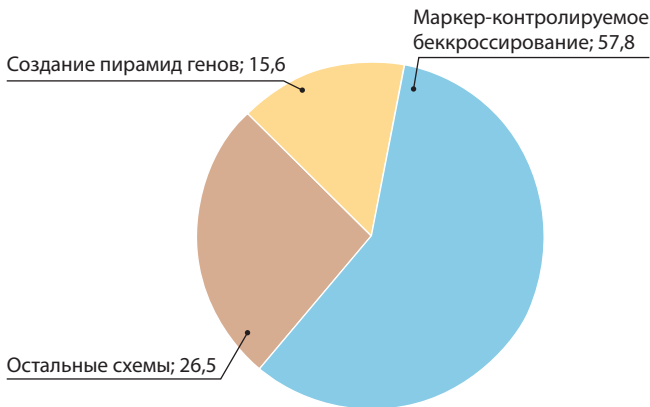


Рис. 3. Интенсивность использования ДНК-генотипирования в разных селекционных схемах (доля, в %, от опубликованных работ в 1995–2009 гг.), согласно оценке Brumlop, Finckh (2011).

ругamiding») для создания сортов со стабильной устойчивостью к фитопатогенам (см. рис. 3). Таким путем можно относительно легко получить в одном генотипе сочетание генов устойчивости к различным патогенам или разным расам одного и того же патогена. Достижение подобного результата без использования маркеров – крайне трудоемкий и длительный процесс (Landjeva et al., 2007; Moose, Mumm, 2008).

Кроме маркер-контролируемого беккроссирования и создания пирамид генов, существует ряд других схем маркер-ориентированной селекции (см. обзорные статьи (Tanksley et al., 1989; Landjeva et al., 2007; Moose, Mumm, 2008; Khlestkina, 2014)).

Следующим после ПЦР изобретением, важным для развития подходов ДНК-генотипирования и особенно для автоматизации этого процесса, что существенно в случае широкомасштабных исследований, стала разработка и усовершенствование ДНК-чипов (Schena et al., 1995). ДНК-чипы могут применяться для анализа участков геномов, в которых имеются однонуклеотидные замены. В геномах живых организмов такие замены встречаются часто, например, у пшеницы – одна замена на ок. 500 пар нуклеотидов (Somers et al., 2003; Paux et al., 2012). Один ДНК-чип может содержать десятки тысяч зондов, маркирующих однонуклеотидные замены. Это, по сути, позволяет при однократном применении достаточно полно исследовать весь геном одного биологического образца. А, поскольку анализ ДНК-чипов полностью автоматизирован, полногеномный анализ может осуществляться в кратчайшие сроки для большого числа биологических образцов. Это открыло новую возможность для селекции. Именно благодаря появлению ДНК-чипов был разработан подход, названный геномной селекцией (ГС), он используется уже во многих программах, в том числе в селекции пшеницы (Heffner et al., 2011; Charmet, Storlie, 2012).

В последние 2–3 года из-за резкого снижения стоимости секвенирования наряду с использованием ДНК-чипов для широкомасштабного генотипирования (в том числе в селекционных программах) стали применяться подходы, в которых базовым методом является секве-

нирование (Elshire et al., 2011; Paux et al., 2012; Poland et al., 2012; Kim et al., 2016). Для геномной селекции в отличие от МОС не требуются знания о генах, влияющих на признаки, или информация об их локализации, т.е. нет необходимости в генетических исследованиях, предшествующих селекционному процессу, а значит, и время, потраченное на предварительные исследования, существенно сокращается. Кроме того, геномная селекция имеет преимущество при отборе по признакам, имеющим сложный полигенный контроль (количественные признаки). Heffner и др. (2010) оценили потенциальную выгоду в случае сложных признаков: только за один год геномной селекции можно добиться вдвое (для озимой пшеницы) и втрое (для кукурузы) большего ответа на отбор, чем за такой же период и при таких же потраченных средствах, но с помощью маркер-ориентированной селекции (в свою очередь, использование МОС позволяет наращивать показатели, как минимум, вдвое интенсивнее, чем при отборе без маркеров).

Итак, геномная селекция оптимальна для отбора по сложным количественным признакам, а маркер-ориентированная селекция эффективна и выгодна в случае признаков с моно- или олигогенным контролем. Оба метода, ГС и МОС, успешно используют в настоящее время для получения новых сортов растений, в том числе и сортов пшеницы (Bespalova et al., 2012; Charmet, Storlie, 2012; Paux et al., 2012; Poland et al., 2012; Randhawa et al., 2013). Если создание сорта с помощью традиционных методов селекции требует 10–15 лет работы, то с использованием ДНК-генотипирования можно получить новый сорт в течение 5–6 лет. В процессе селекции можно сэкономить время, посевные площади, затраты трудовых ресурсов и энергетические затраты за счет экспресс-оценки генотипов, позволяющей отбирать нужные формы в потомстве на ранних стадиях развития растений и избежать трудоемкого тестирования фенотипических признаков (Landjeva et al., 2007; Moose, Mumm, 2008; Khlestkina, 2014).

Если в дополнение к геномной селекции и МОС на некоторых промежуточных и завершающих этапах селекционного процесса использовать метод удвоенных гаплоидов (биотехнологический подход, позволяющий в ускоренном режиме получать гомозиготные формы (Baenziger et al., 1989)), то можно вдвое сократить этапы по времени и сэкономить при создании сорта еще 2–3 года (и даже более в зависимости от применяемой схемы селекции).

Таким образом, управление созданием новых сортов с заданными свойствами стало эффективным и динамичным процессом, позволяющим своевременно создавать формы, как приспособленные к быстро меняющимся условиям окружающей среды (климатические изменения, возникновение и распространение новых фитопатогенов), так и адаптированные к условиям и требованиям хлебопекарной отрасли.

Другие практические аспекты ДНК-идентификации растений. Выше мы рассмотрели возможности молекулярно-генетических подходов для ускорения и повышения эффективности процесса селекции. Однако селекция – это лишь одно звено процесса, начинающегося с поиска полезных генов и исходных форм для селекции

и завершающегося производством пищевых продуктов, а ДНК-технологии могут быть полезны на всех этапах цепочки «предселекционные исследования – селекция – регистрация сорта – семеноводство – производство зерна – производство муки – конечный продукт».

Задачи, связанные с идентификацией генотипа, могут возникать по завершении создания сорта – при его регистрации или на более поздних этапах цепочки. В частности, характеристики, выявляемые методами ДНК-генотипирования, имеют перспективу включения в список критериев для регистрации сортов. Международный союз по охране новых сортов растений (Union Internationale pour la protection des obtentions végétales (UPOV) – франц.) регулярно проводит совещания рабочей группы по биохимическим, молекулярным методам и ДНК-профилированию (Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling), собирает экспертные оценки, касающиеся возможности использования определенных типов и наборов методик для генотипирования различных возделываемых видов растений (<http://www.upov.int>). В некоторых странах предлагаются коммерческие услуги сертифицированных компаний по ДНК-генотипированию сортов растений (пример: <http://www.omicusa.com/services/rice-variety-identification.html>).

ДНК-генотипирование, а также методы определения генотипа с помощью биохимических подходов используются для контроля сортовой принадлежности и сортовой чистоты семенных и товарных партий зерна. Подобный опыт есть как за рубежом, так и в России (примеры: <http://seedcert.oregonstate.edu/>; <http://www.vigg.ru/institut/podrazdelenija/otdel-genetiki-rastenii/ispytatelnaja-laboratorija/>).

Помимо установления сортовой идентичности зерна или произведенных из него пищевых продуктов, могут возникать задачи, связанные с идентификацией в продуктах примесей различного биологического происхождения. Для этого требуется метод генотипирования, позволяющий проводить различия не между сортами одного вида, а между разными видами. Поиском универсальных подходов к видоидентификации живых организмов занялся в 2004 г. международный консорциум «Штрихкод жизни» (Consortium for the Barcode of Life, CBOL <http://www.barcodeoflife.org>). ДНК-штрихкодирование (DNA-barcoding) используется в настоящее время для решения различных биологических задач, и в практических целях (для идентификации компонентов биологического происхождения в составе пищевых продуктов (Galimberti et al., 2013)). Выявлять и устанавливать происхождение растительных примесей в продуктах питания предложено с помощью эффективного метода ДНК-генотипирования, основанного на анализе полиморфизма длины интронов (Ponzoni et al., 2013). Для проверки безглютеновой диетической пищи на отсутствие примесей определенных злаков или же определенных глиадинокодирующих генов также разработаны специальные тесты, основанные на анализе ДНК (Dahinden et al., 2001; Martín-Fernandez et al., 2015).

Идентификация генов и генотипов имеет важное значение и на этапах, предшествующих селекции. Так, при поиске исходных родительских форм для скрещивания с помощью ДНК-генотипирования можно отобрать в гено-

фондах наиболее подходящие образцы, несущие нужные варианты определенных генов. Этому предшествуют генетические исследования, направленные на выявление локализации генов на хромосомах и подбор диагностических ДНК-маркеров для «мониторинга» генов. К настоящему моменту на хромосомах пшеницы с помощью ДНК-маркеров картированы сотни хозяйственно ценных генов и локусов количественных признаков (McIntosh et al., 2015).

Путем маркер-контролируемого введения полезных генов от диких видов в культурные формы растений можно целенаправленно создавать исходный материал для селекции (например, (Timonova et al., 2013)).

Без ДНК-генотипирования не обойтись и в процессе постоянного поддержания и пополнения генофондов возделываемых растений и их сородичей как источников природного генетического разнообразия для задач селекции. Методы генотипирования облегчают систематизацию материала, выявляют дубликации (Dobrovolskaya et al., 2005), позволяют оценивать внутривидовое генетическое разнообразие в коллекциях (Huang et al., 2002; Mitrofanova et al., 2012) и его изменение с течением времени (Khlestkina et al., 2004), а также разрабатывать геномные паспорта сортов (Хлесткина и др., 2004).

Молекулярно-генетические исследования для управления технологическими свойствами зерна пшеницы

Для ускоренного получения сортов с заданными технологическими свойствами важно иметь представление о генетических механизмах, обеспечивающих разнообразие по технологическим свойствам зерна и муки, обладать информацией о локализации и структуре генов, детерминирующих эти свойства, и владеть набором диагностических ДНК-маркеров для экспресс-отбора генотипов в процессе селекции, позволяющего избегать применения трудоемких методов анализа технологических свойств на промежуточных этапах.

Содержание белка и сырой клейковины. Важнейшей характеристикой, используемой, в частности, при оценке и приемке выращенного зерна, является содержание белка и клейковины в зерне пшеницы. Селекция на высокое содержание белка сопряжена с определенными трудностями. Во-первых, в его генетический контроль, как показывают многие, в том числе и современные исследования, вовлечено много генов с аддитивным эффектом (Morris et al., 1973; Tarkowski, Otlowska-Miazga, 1976; Храброва, Майстренко, 1980, 1984; Groos et al., 2003; Prasad et al., 2003). Во-вторых, изменчивость по этому признаку тесно связана с общей реакцией растения на абиотические и биотические факторы. Однако если высокий уровень содержания белка и клейковины жестко контролируется со стороны генома, то он сохраняется и при варьировании условий среды. Примером может быть сорт пшеницы Диамант 2, который сохраняет высокие показатели по этому признаку в любых условиях (Майстренко и др., 1969; Пшеничникова и др., 2006). Совсем недавно было показано, что данный сорт несет дикий тип аллеля гена *NAM-B1* (*Gpc-B1*), определяющего высокое содержание белка в зерне (Asplund et al., 2013).

Для содержания белка часто наблюдается обратная корреляция с урожайностью (Simmonds, 1995). Тем не менее, благодаря развитию работ по генетике пшеницы, удалось выявить гены, использование которых в селекции позволяет преодолевать указанные трудности (табл. 4). Наиболее убедительным примером стала идентификация в геноме дикорастущей пшеницы *T. dicoccoides* гена, обеспечивающего высокое содержание белка в зерне, – *Gpc-B1* (Jorra, Cantrell, 1990; Deckard et al., 1996). Этот ген удалось перенести мягкой пшенице, у которой он повышал содержание белка в зерне, но оказывал лишь незначительный отрицательный эффект на урожайность и другие хозяйственно ценные признаки (Deckard et al., 1996; Kovacs et al., 1998). *Gpc-B1* детально изучен на молекулярном уровне, для него разработаны диагностические маркеры (Mesfin et al., 1999; Khan et al., 2000; Distelfeld et al., 2006; Uauy et al., 2006), эффективность использования которых в селекции пшеницы на содержание белка получила множество подтверждений. Например, Vishwakarma и др. (2014) использовали диагностический маркер *Xicw108* для введения *Gpc-B1* в элитный сорт пшеницы, а также 86 микросателлитных маркеров для контролируемого восстановления генома сорта-реципиента в ходе возвратных скрещиваний. В результате за 2,5 года (пять вегетационных периодов) ген *Gpc-B1* был введен, содержание белка возросло с 10 до 13–17 %, а геном элитного сорта восстановлен в дочерних линиях почти на 90 %. Молекулярно-генетическое картирование позволило выявить и другие гены (локусы), контролирующие высокое содержание белка, например, *QGpc.ipk-7B* (Khlestkina et al., 2009), *QGlc.ipk-5B* и *QGlc.ipk-7A* (Пшеничникова и др., 2008). *QGpc.ipk-7B* также не оказывал отрицательного эффекта на продуктивность (Khlestkina et al., 2009).

Мукомольные свойства. Рыночная классификация сортов мягкой пшеницы основана, в первую очередь, на характеристиках текстуры эндосперма, обуславливающей производственное назначение муки (см. табл. 1). Твердозерность, определяемая через диаметр частиц муки при размоле, контролируется локусом *Ha*, который находится в коротком плече хромосомы 5D. Он содержит в своем составе несколько генов: *Pina-D1* и *Pinb-D1*, кодирующих белки-пуриноидины (PINa и PINb), и ген *GSP1*, кодирующий белок «мягкозерности». Вместе они формируют сложный белок фриабилин, локализующийся на поверхности крахмальных гранул у пшеницы с мягкой текстурой эндосперма. Пуриноидины и *GSP1* присутствуют и у твердозерных сортов мягкой пшеницы, но степень их адгезии на поверхности крахмальных гранул меняется и коррелирует со степенью твердозерности в зависимости от сочетания разных аллелей генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* (Turner et al., 1999; Ikeda et al., 2005; Ram et al., 2005; Chen et al., 2006). Диагностические маркеры к генам *Pina* и *Pinb* (Gautier et al., 1994; Giroux, Morris, 1997, 1998; Tranquilli et al., 1999; Li et al., 2008; Huang, Brûlé-Babel, 2011; см. табл. 4) используют для оценки селекционного материала и сортовых коллекций (Chen et al., 2006; Eagles et al., 2006; Wang et al., 2008).

Стекловидность – признак, учитываемый при различных видах оценки качества зерна и муки в России, коррелирует с твердозерностью, однако не равнозначен ей.

Уровень стекловидности определяет не только выход высококачественных фракций муки (крупок) при размоле. С ней связана доступность крахмала белково-крахмального комплекса для дрожжей при расстойке теста или, наоборот, целостность крахмальных гранул при изготовлении кондитерских изделий. Стекловидность и твердозерность не равнозначны и генетически. Так, в картирующей популяции ITMI, использованной для поиска локусов, ассоциированных с технологическими свойствами зерна, в районе гена *Ha* на хромосоме 5D были картированы QTL одновременно для стекловидности и твердозерности. Однако на хромосомах 2D и 3A были картированы независимые главные локусы *QVtr.ipk-2D* и *QVtr.ipk-3A*, связанные со стекловидностью (Пшеничникова и др., 2008). Интересно, что *QVtr.ipk-3A* совпадал по положению с ранее найденным локусом, связанным с мукомольными показателями в другой картирующей популяции (Parker et al., 1999). С другой стороны, *QVtr.ipk-2D* был картирован в одном положении с массой 1000 зерен – важным мукомольным показателем, определяющим выход муки при размоле. Для этого признака картировано множество локусов в геноме пшеницы, почти в каждой хромосоме. Практического внимания заслуживают локусы, для которых подобраны диагностические ДНК-маркеры (см. табл. 4). В частности, гены *TaCwi-A1* (Ma et al., 2012) и *TaGW2-6A* (Su et al., 2011) были идентифицированы в хромосомах 2A и 6A пшеницы путем поиска соответствующих генов-ортологов из генома риса. Они дают прибавку по 2,4 и 3,0 г к массе 1000 зерен соответственно. К ним подобраны диагностические ДНК-маркеры (см. табл. 4). В селекции также может быть использован локус *QTgr.ipk-7D*, перенесенный в сорт мягкой пшеницы Prinz от синтетического гексаплоида. Он картирован в интервале микросателлитных локусов *Xgwm295-Xgwm1002* дистального района хромосомы 7DS4-0.61-1.00 (Röder et al., 2008).

Реологические свойства муки и теста. Эластичность теста определяет его пригодность для того или иного вида мучных изделий (см. табл. 1). В России наиболее широко употребляют дрожжевой хлеб, для которого требуется мука с высокой силой и сбалансированной упругостью и растяжимостью, которые, в свою очередь, обуславливают высокие хлебопекарные качества. Физико-химические свойства теста обеспечиваются образованием в процессе замеса муки сложного непрерывного трехмерного белкового матрикса, состоящего из множества запасных белков эндосперма различного аминокислотного состава. Его формирование – сложная цепь биологических процессов биосинтеза, находящихся под контролем многих генных сетей. В настоящее время хорошо изучена роль запасных белков зерновки – глиаина и глютенина – в образовании клейковины. Если глиадины, образующие длинные линейные молекулы, относительно мало влияют на силу муки, то глютениновые белки, способные образовывать межмолекулярные дисульфидные связи, играют большую роль в формировании трехмерной структуры клейковины. Поэтому аллели, кодирующие белки с высокой концентрацией серосодержащих аминокислот, благоприятны для сортов хлебопекарного назначения. Это, прежде всего, аллели высокомолекулярного глютенина *Glu-A1a* и *b* в хромосоме 1A и *Glu-D1d* в 1D (Cornish et al., 2006),

Таблица 4. ДНК-маркеры для управления технологическими свойствами зерна пшеницы на генетическом уровне

Признак	Информация для отбора по генотипу (основные примеры)		
	Гены/локализация (источники)	ДНК-маркеры	Ссылки
Мукомольные свойства			
масса 1000 зерен	<i>TaCwi-A1/2AL</i> (источник: Doumai)	CW121, CW122	Ma et al., 2012
	<i>TaGw2-6A/6A</i> (источник: южные пшеницы Китая)	CAPS-маркеры	Su et al., 2011
	<i>QTgw.ipk-7D</i> (источник: Prinz)	<i>Xgwm1002</i>	Röder et al., 2008
стекловидность	<i>QVitr.ipk-2D</i> (источник: синтетик W7984)	<i>Xcdo1379</i>	Пшеничникова и др., 2008
	<i>QVitr.ipk-5D</i> (источник: Opata 85)	<i>Xfba393b</i>	Там же
	<i>QVitr.ipk-3A</i> (источник: Opata 85)	<i>Xmwg30</i>	Там же
твердозерность	<i>Pina-D1/5DS</i> <i>Pinb-D1/5DS</i>	Ряд ПЦР- и CAPS-маркеров	Gautier et al., 1994; Giroux, Morris, 1997, 1998; Tranquilli et al., 1999; Li et al., 2008; Huang, Brûlé-Babel, 2011
	Содержание белка и сырой клейковины в зерне	<i>Gpc-B1</i> / 6BS (источники: ND683, Yecora rojo, Anza, Kern)	<i>Xuhw89</i> , <i>Xucw108</i> , <i>Xucw109</i>
<i>Gpc-B2</i> (7BS)		<i>Xgwm537</i>	Khlestkina et al., 2009
<i>QGl.c.ipk-5B</i> (источник: синтетик W7984)		<i>Xtam72c</i>	Пшеничникова и др., 2008
<i>QGl.c.ipk-7A</i> (источник: синтетик W7984)		<i>Xcdo475b</i>	Там же
<i>QWgc.sdau-6D</i> (источник: Chuan 350505)		<i>Xswes426b</i>	Sun et al., 2008
Свойства крахмала	<i>Wx-A1/7AS</i> , <i>Wx-B1/4AL</i> , <i>Wx-D1/7DS</i>	Ряд доминантных и кодоминантных ПЦР-маркеров	Shariflou, Sharp, 1999; Vrinten et al., 1999; McLauchlan et al., 2001; Shariflou et al., 2001; Nakamura et al., 2002
Реологические свойства муки и теста			
сила муки (альвеограф)	<i>Glu-1</i> и <i>Glu-3</i> (аллели высоко- и низкомолекулярных глютеинов)	Белковые маркеры, определяемые с помощью SDS-электрофореза	Rasheed et al., 2014 (обзор)
	<i>QDse.icg-4D</i> (источник: Саратовская 29)	<i>Xgwm165</i>	Pshenichnikova et al., 2012
	<i>QDse.ipk-5DL</i> (источник: Opata 85)	<i>Xsud30</i>	Пшеничникова и др., 2008
	<i>QDstren.upm-2AS</i> (источник: Marius)	<i>Xwmc522</i>	Kerfal et al., 2010
упругость (альвеограф)	<i>QTen.ipk-1BL</i> (источник: Opata 85)	<i>Xcdo1189</i>	Пшеничникова и др., 2008
	<i>QTen.ipk-4BL</i> (источник: Opata 85)	<i>Xcdo1312a</i>	Там же
	<i>QDten.upm-2AS</i> (источник: Marius)	<i>Xwmc522</i> , <i>Xwmc177</i>	Kerfal et al., 2010
	<i>QDten.upm-1DL</i> (источник: Cajeme71)	<i>Xcfd92</i> , <i>Xgdm126</i>	Там же
растяжимость (альвеограф)	<i>QExt.ipk-1AL</i> (источник: Opata 85)	<i>Xmwg55</i> (<i>Glu-A1</i>)	Пшеничникова и др., 2008
	<i>QDext.upm-5AS</i> (источник: Cajeme71)	<i>Xgwm304</i> , <i>Xgwm293</i>	Kerfal et al., 2010
	<i>QDext.upm-1DL</i> (источник: Marius)	<i>Xcfd92</i> , <i>Xgdm126</i>	Там же
водопоглотительная способность (по фаринографу)	<i>QFab.crc-4D</i> (источник: AC Domain)	<i>Xwmc473</i>	McCartney et al., 2006
	<i>QFwa.mna-1A</i> (источник: линия MN99394)	<i>XwPt1782-XwPt231</i>	Tsilo et al., 2013
время образования теста (по фаринографу)	<i>QDdt.mna-1B</i> (источник: линия MN99394)	<i>Xgpw93013c</i>	Tsilo et al., 2013
	<i>QFddt.crc-1B</i> (источник: RL4452)	<i>Xgwm403-Xgwm274</i>	McCartney et al., 2006

Окончание табл. 4

Признак	Информация для отбора по генотипу (основные примеры)		
	Гены/локализация (источники)	ДНК-маркеры	Ссылки
стабильность (по фаринографу)	<i>Glu-D1</i> (источник: линия MN98550)	<i>Umn26</i>	Tsilo et al., 2013
	<i>QFsta.crc-4B</i> (источник: AC Domain)	<i>Xwmc617-Xgwm540</i>	McCartney et al., 2006
разжижение (по фаринографу)	<i>Glu-D1</i> (источник: линия MN98550)	<i>Umn26</i>	Tsilo et al., 2013
	<i>QFtd.crc-1B</i> (источник: AC Domain)	<i>Xgwm131-Glu-B1</i>	McCartney et al., 2006
Цвет муки	QTL/7AL (источник: Schomburgk)	<i>Xwua26.4</i>	Parker et al., 1998; Parker, Langridge, 2000;
	<i>Psy-B1</i>	Ряд STS-маркеров	He et al., 2009
	<i>Lpx-B1</i>	LOXA-L/R	Carrera et al., 2007

которые целенаправленно вводят в сорта пшеницы. Низкомолекулярные глютеины, кодируемые локусом *Glu-3*, также тесно коррелируют с эластичностью теста (Juhász, Gianibelli, 2006). Аллели *Glu-A3d* и *Glu-B3b* положительно влияют на силу муки. Однако многокомпонентность этой группы белков, их сходство по аминокислотному составу с глиадами, а также тесное сцепление локусов *Gli-1* и *Glu-3* в хромосомах первой гомеологической группы не позволяют пока надежно использовать их для селекции.

Много локусов, ассоциированных с разнообразием по реологическим свойствам муки и теста, обнаруживаются в экспериментах с использованием картирующих популяций (см. табл. 4). Очень часто они колокализуются с генами, кодирующими запасные белки в хромосомах первой гомеологической группы. Вместе с тем часть локусов картируется в других хромосомах генома. Так, в работе McCartney и др. (2006) локусы для смесительных свойств (по миксографу) были картированы в районе генов *Glu-B1* и *Glu-B3*, а также на хромосомах 4B, 4D и 7D. В работе с использованием картирующей популяции ITMI сила муки и упругость были картированы в длинном плече хромосом 5D, а растяжимость была ассоциирована с локусом в районе гена *Glu-A1* (Пшеничникова и др., 2008). Главный локус для многих смесительных характеристик теста был найден в канадской картирующей популяции в хромосоме 4D в районе локуса *Xwmc52* (McCartney et al., 2006). Интересно, что в хромосоме 4D, в близком районе этой хромосомы в районе маркера *Xgwm165* у сорта Саратовская 29, обладающего великолепными реологическими свойствами теста, также был картирован локус, ассоциированный с силой муки и упругостью (Pshenichnikova et al., 2012).

Цвет муки. Белизна муки отражает ее сортность. Чем меньше в муке отрубистых частиц, тем она белее. В настоящее время, как правило, проводят химическое отбеливание муки. Для отбеливания чаще всего используют пероксид кальция (E930) и пероксид бензоила (E928). Однако цвет муки и потребность в отбеливании могут быть отрегулированы на генетическом уровне. Parker с коллегами (1998) показали, что влияние на цвет муки, с одной стороны, генов и, с другой стороны, факторов

окружающей среды соотносится примерно как 2 : 1. Практически в каждой хромосоме пшеницы найдены локусы, которые влияют на окраску пшеницы (Balyan et al., 2013).

Цвет муки также присущ сортам пшеницы, вырабатывающим много каротиноидов. Parker и Langridge (2000) отметили, что многие современные высокопродуктивные сорта мягкой пшеницы имеют повышенное содержание этих пигментов в муке. Гены пшеницы, участвующие в биосинтезе каротиноидов, хорошо известны (Fisco et al., 2014). Предложен ряд ДНК-маркеров для отбора генотипов с заданным уровнем каротиноидов и цветом муки (Parker, Langridge, 2000; Elouafi et al., 2001; He et al., 2009; см. табл. 4).

Обесцвечивание муки может быть обусловлено высокой активностью фермента липоксигеназы (Borrelli et al., 1999). Активность липоксигеназы связана с локусом на хромосоме 4BS пшеницы, хорошо изученном на молекулярном уровне (Hessler et al., 2002; Zhang et al., 2015). Разработаны ДНК-маркеры для контроля активности этого фермента (Carrera et al., 2007; Zhang et al., 2015). Потемнение продуктов, произведенных из муки, может быть связано с активностью фермента полифенолоксидазы (Zheng et al., 2013). Результаты, полученные Chang и др. (2007) и Fuerst с коллегами (2008), указывают на потенциальную возможность корректировки уровня данного фермента на генетическом уровне.

На цвет муки также могут влиять содержание белка в зерне, стекловидность, твердозерность, размер и форма зерна и окраска семенной оболочки (Zhang, Tian, 2008), которые также наследуются. В частности, окраска семенной оболочки краснозерных сортов определяется генами *R*, активирующими синтез пигментов проантоцианидинов (McIntosh et al., 2015). Нефункциональные варианты гена *R* в белозерных сортах идентифицированы, и разработаны ДНК-маркеры для селекции (Himi et al., 2011).

Свойства крахмала. Один из основных компонентов пшеничной муки – крахмал, его относительное содержание и химический состав влияют на качество продуктов, получаемых из пшеницы. Крахмал представляет собой полимер глюкозы, состоящий из двух различных типов структур: амилозы (линейный полимер) и амилопекти-

на (разветвленная структура). Ключевым ферментом в синтезе амилозы является грануло-связанная синтетаза крахмала I (GBSS I), которую кодируют гены *Waxy* (*Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* (Nakamura et al., 1993)). У пшеницы встречаются частичные или полные (по всем трем генам *Wx*) мутанты. Степень влияния на содержание амилозы убывает в ряду *Wx-B1* > *Wx-D1* > *Wx-A1* (Yamamoto, Quynh, 2000). У полных мутантов крахмал состоит только из амилопектина. Синтез амилопектина более сложен и требует участия нескольких ферментов. Соотношение амилозы и амилопектина – важный показатель для производства различных изделий, кроме того, уменьшение количества амилозы может положительно влиять на срок хранения хлебобучных изделий (Климушина и др., 2010). В настоящее время разработан ряд диагностических маркеров для мутантных вариантов генов *Waxy* (Shariflou, Sharp, 1999; Vrinten et al., 1999; McLauchlan et al., 2001; Shariflou et al., 2001; Nakamura et al., 2002; см. табл. 4), которые позволяют управлять соотношением амилозы и амилопектина у создаваемых генотипов пшеницы и включены в селекционный процесс (Randhawa et al., 2013).

Средства, предлагаемые для ускорения создания сортов с заданными технологическими свойствами зерна и муки, не исчерпываются приведенным набором генов и маркеров пшеницы (см. табл. 4). Постоянно идут исследования по разработке новых маркеров (например, в 2014 г. Liu и др. маркировали 27 локусов, связанных с технологическими свойствами зерна и муки озимой пшеницы) и по выявлению источников новых генов или новых улучшенных вариантов уже известных генов. Поиск проводится как среди имеющегося генофонда мягкой пшеницы, так и с привлечением близкородственных видов пшениц и эгилопсов. Так, анализ коллекции современных и стародавних яровых сортов мягкой пшеницы, которые выращивались в Сибири на протяжении XX в., показал значимо более высокий уровень клейковины, высокую упругость и растяжимость теста у стародавних сортов, возделываемых в первой половине XX в., по сравнению с современными (Morozova et al., 2015). Идет работа по идентификации генов стародавних сортов и разработке диагностических маркеров, необходимых для вовлечения выявленного генетического потенциала в селекцию на качество зерна мягкой пшеницы.

Гены близкородственных видов (различных видов пшениц и эгилопсов) могут стать источником для разнообразия по технологическим свойствам зерна пшеницы, примером тому служит упомянутый выше *Gpc-B1*, интрогрессированный в геном мягкой пшеницы от *T. dicoccoides*. Вместе с ним и другие гены близкородственных видов можно использовать для увеличения содержания белка в зерне мягкой пшеницы (De Pace et al., 2001; Zanetti et al., 2001; Kunert et al., 2007) и для улучшения хлебопекарных свойств (Garg et al., 2014). Источниками высокого содержания клейковины в зерне могут быть виды *T. timopheevii*, *Aegilops speltoides* (Pshenichnikova et al., 2015), а также *Ae. markgrafii*. Последний вид может быть источником не только этого признака, но и повышенной стекловидности и физических свойств теста (Ermakova et al., 2011).

С применением знаний и методов современной генетики пшеницы можно не только добиваться ускоренного

получения сортов пшеницы с заданными технологическими свойствами зерна и муки, но и решать особые задачи, например, связанные с получением гипоаллергенной пшеницы (Waga, Skoczowski, 2014). Получение «безглютеновых» сортов позволит отойти от практики полного исключения из рациона людей, больных целиакией, продуктов, произведенных из пшеничной муки, и тем самым сохранить для них возможность употребления множества питательных веществ и микроэлементов, содержащихся в зерне пшеницы.

Результаты многолетних исследований в области генетики пшеницы показали, что в основе различий по хлебопекарному качеству лежит генетическое разнообразие, заложенное в сортах. Современный уровень исследований позволяет разрабатывать диагностические ДНК-маркеры для ускоренной селекции пшеницы с заданными технологическими свойствами зерна и муки. Таким образом, расширяются возможности для решения задачи обеспечения хлебопекарных предприятий качественным сырьем для производства хлеба – традиционного русского продукта.

Благодарности

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (проект № 0324-2015-0005).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Давоян Э.Р., Беспалова Л.А., Давоян Р.О., Зубанова Ю.С., Миков Д.С., Филобок В.А., Худокормова Ж.Н. Использование молекулярных маркеров в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18:732-738.
- Дефекты хлеба. Сайт профессиональных хлебопеков и кондитеров. 2015. <http://hlebinfo.ru/defektyi-hleba.html>. Дата посещения сайта: 26 ноября 2015 г.
- Кильчевский А.В., Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Аджиева В.Ф., Мальшев 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. Минск: Белорусская наука, 2014;4(11):290-344.
- Климушина М.В., Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Об оптимизации систем молекулярного маркирования *Waxy*-генов пшеницы для целей MAS-селекции. С.-х. биология. 2010;5:36-41.
- Майстренко О.И., Трошина А.В. Проблемы генетики качества клейковины пшеницы. Сообщение I. Изменчивость качества клейковины гибридов мягкой пшеницы в зависимости от подбора родительских сортов. Генетика. 1966;9:124-133.
- Майстренко О.И., Трошина А.В., Лысенко Р.Г., Ермакова М.Ф., Храброва М.А. О перспективах селекции пшеницы на высокое содержание белка и клейковины. Селекция и семеноводство. 1969;2:27-31.
- Мировой рынок зерна-2014/15: под влиянием рекордов производства и снижения цен (АПК-Информ: Итоги № 6). 15 декабря 2014. <http://www.apk-inform.com/ru/exclusive/opinion/1039595#VIQon3bhCU>
- Позняковский В.М., Гурьев Ю.Г., Бебенин В.В. Пищевые и биологические активные добавки: характеристика, применение, контроль. Кемерово, 2011;1-275.

- Позняковский В.М., Челнакова Н.Г., Кузнецова О.С., Гаврилов А.Ф. Кризис питания современного человека: вопросы качества и безопасности пищевых продуктов. Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2004;1:6-7.
- Производство пшеницы в России по регионам. Итоги 2014 года. Экспертно-аналитический центр агробизнеса. <http://ab-centre.ru/articles/proizvodstvo-pshenicy-v-rossii-v-2014-godu>. Дата посещения сайта: 26 ноября 2015 г.
- Пумпянский А.Я. Технологические свойства мягких пшениц (по данным мировой коллекции ВИР). Ленинград, 1971.
- Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф., Попова Р.К. Технологические качества зерна и муки мягкой пшеницы в линиях с межсортовым замещением хромосом 1 и 6 гомеологических групп. С.-х. биология. 2006;1:57-62.
- Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф., Чистякова А.К., Щукина Л.В., Березовская Е.В., Лохвассер У., Рёдер М., Бёрнер А. Картирование локусов количественных признаков (QTL), ассоциированных с показателями качества зерна мягкой пшеницы, выращенного в различных условиях среды. Генетика. 2008;44(1):74-84.
- Сердюкова Ю.С. Хлебопекарная промышленность: особенности формирования механизма управления факторами эффективности. Новосибирск: НГУ, 2004;1-106.
- Сердюкова Ю.С. Новые инструменты системы поддержки принятия управленческих решений на рынке хлеба. KZ: Zhasgalym. 2012;2:51-58.
- Урбанович О.Ю., Козловская З.А., Хацкевич А.А., Картель Н.А. Молекулярные методы в селекции яблони на устойчивость к краснойгалловой яблонной тле. С.-х. биология. 2013;5:54-60.
- Усенко Н., Сафьянов В. Проблемы пекарей Кузбасса в новых условиях. Хлебопродукты. 1996;8:9-11.
- Усенко Н., Сердюкова Ю. Региональный зерновой фонд как механизм реализации взаимодействия бизнеса и власти. Хлебопродукты. 2005;6:2-3.
- Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы. Генетика. 2006;42:725-736.
- Хлесткина Е.К., Салина Е.А., Шумный В.К. Генотипирование отечественных сортов мягкой пшеницы с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. С.-х. биология. 2004;5:44-52.
- Храброва М.А., Майстренко О.И. Моносомный генетический анализ содержания белка зерновки и ее массы у мягкой пшеницы сорта Диамант 2. Генетика. 1980;16(8):1425-1434.
- Храброва М.А., Майстренко О.И. Локализация хромосом пшеницы сорта Диамант 1, контролирующих уровень белка в зерне, методом моносомного реципрокного анализа дисомного потомства F2. С.-х. биология. 1984;12:44-47.
- Arbuzova V.S., Ermakova M.F., Popova R.K. Studies of monosomic lines of cv. Saratovskaya 29 on productivity and grain technological properties. EWAC Newsletter. Proc. 11th EWAC Conf., Novosibirsk, Russia, 24-28 July, 2000. Eds T.A. Pshenichnikova, A.J. Worland, 2001;80-82.
- Asplund L., Bergkvist G., Leino M.W., Westerbergh A., Weih M. Swedish spring wheat varieties with the rare high grain protein allele of NAM-B1 differ in leaf senescence and grain mineral content. PLoS ONE. 2013;8(3):e59704. DOI 10.1371/journal.pone.0059704.
- Baenziger P.S., Wesenberg D.M., Smail V.M., Alexander W.L., Schaeffer G.W. Agronomic performance of wheat doubled haploid lines derived from cultivars by anther culture. Plant Breeding. 1989;103:101-109.
- Balyan H.S., Gupta P.K., Kumar S., Dhariwal R., Jaiswal V., Tyagi S., Agarwal P., Gahlaut V., Kumari S. Genetic improvement of grain protein content and other health-related constituents of wheat grain. Plant Breeding. 2013;132:446-457.
- Beckmann J.S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 1983;67:35-43.
- Bespalova L.A., Vasilyev A.V., Ablova I.B., Filobok V.A., Khudokormova Zh.N., Davoyan R.O., Davoyan E.R., Karlov G.I., Soloviev A.A., Divashuk M.G., Mayer N. K., Dudnikov M.V., Mironenko N.V., Baranova O.A. The use of molecular markers in wheat breeding at the Lukyanenko Agricultural Research Institute. Russ. J. Gen.: Appl. Res. 2012;2:286-290.
- Biffen R.H. On the inheritance of strength in wheat. J. Agric. Sci. 1908;II:88-101.
- Borrelli G.M., Troccoli A., Di Fonzo N., Fares C. Durum wheat lipoxigenase activity and other quality parameters that affect pasta color. Cereal Chemistry. 1999;76(3):335-340.
- Brumlop S., Finckh M.R. Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding. Final report of the F+E project "Applications and Potentials of Smart Breeding" (FKZ 350 889 0020) on behalf of the Federal Agency for Nature Conservation (ISBN 978-3-89624-033-0), Bonn, Germany, 2011.
- Burr B., Evola S.V., Burr F.A., Beckmann J.S. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: J.K. Setlow et al. (eds) Genetic Engineering. New York: Plenum Press, 1983;45-59.
- Carrera A., Echenique V., Zhang W., Helguera M., Manthey F., Schragger A., Picca A., Cervigni G., Dubcovsky J. A deletion at the Lpx-B1 locus is associated with low lipoxigenase activity and improved pasta color in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). J. Cereal Science. 2007;45:67-77.
- Chang C., Zhang H.P., Xu J., You M.S., Li B.Y., Liu G.T. Variation in two PPO genes associated with polyphenol oxidase activity in seeds of common wheat. Euphytica. 2007;154:181-193.
- Charmet G., Storlie E. Implementation of genome-wide selection in wheat. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012;2:298-303.
- Chen F., He Z.H., Xia X.C., Xia L.Q., Zhang X.Y., Lillemo M., Morris C.F. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. Theor. Appl. Genet. 2006;112:400-409.
- Cornish G.B., Békés F., Eagles H.A., Payne P.I. Prediction of dough properties for bread wheats. In: Gliadin and Glutenin. The unique balance of wheat quality. Ed.: C. Wrigley, F. Békés, W. Bushuk. AACC International. 2006;243-279.
- Dahinden I., von Büren M., Lüthy J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. Eur. Food Res. Technol. 2001;212:228-233.
- De Pace C., Snidaro D., Ciaffi M., Vittori D., Ciofo A., Cenci A., Tanzarella O.A., Qualset C.O., Scarascia Mugnozza G.T. Introgression of *Dasypyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. Euphytica. 2001;117:67-75.
- Deckard E.L., Joppa L.R., Hammond J.J., Hareland G.A. Grain protein determinants of the Langdon durum-dicoides chromosome substitution lines. Crop Science. 1996;36(6):1513-1516.
- Distelfeld A., Uauy C., Fahima T., Dubcovsky J. Physical map of the wheat high-grain protein content gene Gpc-B1 and development of a high-throughput molecular marker. New Phytol. 2006;169: 753-763.
- Dobrovolskaya O., Saleh U., Malysheva-Otto L., Röder M.S., Börner A. Rationalising germplasm collections: a case study for wheat. Theor. Appl. Genet. 2005;111:1322-1329.
- Eagles H.A., Bariana H.S., Ogbonnaya F.C., Rebetzke G.J., Hollamby G.J., Henry R.J., Henschke P.H., Carter M. Implementation of markers in Australian wheat breeding. Australian J. Agriculture. Res. 2001;52:1349-1356.
- Eagles H.A., Cane K., Eastwood R.F., Hollamby G.J., Kuchel H., Martin P.J., Cornish G.B. Contributions of glutenin and puroindoline genes to grain quality traits in southern Australian wheat breeding programs. Australian J. Agriculture. Res. 2006;57(2): 179-186.
- Elouafi I., Nachit M.M., Martin L.M. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). Hereditas. 2001; 135:255-261.
- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS ONE. 2011;6: e19379. DOI 10.1371/journal.pone.0019379.

- Ermakova M.F., Chistyakova A.K., Shchukina L.V., Pshenichnikova T.A., Morozova E.V., Simonov A.V., Weidner A., Börner A. Technological properties of grain and flour in bread wheat lines with introgressions from *Aegilops speltoides* and *Aegilops markgrafii*. AGRISAFE Final conference "Climate change: Challenges and Opportunities in Agriculture", March 21–23, 2011, Budapest, Hungary, 2011;63-66.
- Ermakova M.F., Pshenichnikova T.A., Shchukina L.V., Osipova S.V., Mitrofanova T.N., Börner A., Lohwasser U., Röder M. The history of the development of precise genetic stocks of bread wheat in Novosibirsk and their application for investigation of grain quality. EWAC Newsletter. Proc. 14th EWAC Conf., Istanbul, Turkey, 6–10 May, 2007, Ed. A. Börner, J. Snape, 2008;12-16.
- Ficco D.B.M., Mastrangelo A.M., Trono D., Borrelli G.M., De Vita P., Fares C., Beleggia R., Platani C., Papa R. The colours of durum wheat: a review. *Crop Pasture Science*. 2014;65:1-15.
- Fuerst E.P., Xu S.S., Beecher B. Genetic characterization of kernel polyphenol oxidases in wheat and related species. *J. Cereal Science*. 2008;48:359-368.
- Galimberti A., De Mattia F., Losa A., Bruni I., Federici S., Casiraghi M., Martellos S., Labra M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res. International*. 2013;50:55-63.
- Garg M., Kumar R., Singh R.P., Tsujimoto H. Development of an *Aegilops longissima* substitution line with improved bread-making quality. *J. Cereal Science*. 2014;60:389-396.
- Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A., Marion D., Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, two cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.* 1994;25:43-57.
- Giroux M.J., Morris C.F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95:857-864.
- Giroux M.J., Morris C.F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS*. 1998;95:6262-6266.
- Groos C., Robert N., Bervas, E., Charmet G. Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2003;106:1032-1040.
- He X.Y., He Z.H., Ma W., Appels R., Xia X. C. Allelic variants of phytoene synthase 1 (Psy1) genes in Chinese and CIMMYT wheat cultivars and development of functional markers for flour colour. *Mol. Breeding*. 2009;23:553-563.
- Heffner E.L., Jannink J.-L. Sorrells M.E. Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. *Plant Genome*. 2011;4:65-75.
- Heffner E.L., Lorenz A.J., Jannink J.-L. Sorrells M.E. Plant Breeding with Genomic Selection: Gain per Unit Time and Cost. *Crop Science*. 2010;50:1681-1690.
- Hessler T.G., Thomson M.J., Benschler D., Nachit M.M., Sorrells M.E. Association of a lipoxigenase locus, Lpx-B1, with variation in lipoxigenase activity in durum wheat seeds. *Crop Science*. 2002;42(5):1695-1700.
- 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.
- Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganai M.W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105:699-707.
- Huang X.Q., Brülé-Babel A. Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Cereal Sci.* 2011;53:277-284.
- Ikeda T.M., Ohnishi N., Nagamine T., Oda S., Hisatomi T., Yano H. Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 2005;41:1-6.
- Joppa L.R., Cantrell R.G. Chromosomal location of genes for grain protein content of wild tetraploid wheat. *Crop Science*. 1990;30(5):1059-1064.
- Juhász A., Gianibelli M.C. Low-molecular-weight glutenin subunits: insights into this abundant subunit group present in glutenin polymers. In: Gliadin and Glutenin. The unique balance of wheat quality. Eds: C. Wrigley, F. Békés, W. Bushuk. AACC International, 2006; 171-212.
- Kerfal S., Giraldo P., Rodríguez-Quijano M., FranciscoVázquez J., Adams K.M., Lukow O.M., Röder M.S., Somers D., Carrillo J.M. Mapping quantitative trait loci (QTLs) associated with dough quality in a soft hard bread wheat progeny. *J. Cereal Science*. 2005;52:6-52.
- Khan I.A., Procnunier J.D., Humphreys D.G., Tranquilli G., Schlatter A.R., Marcucci-Poltri S., Froberg R., Dubcovsky J. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* transferred to bread wheat. *Crop Science*. 2000;40(2):518-524.
- Khlestkina E.K. Molecular methods for analyzing the structure–function organization of genes and genomes in higher plants. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2012;2: 243-251.
- Khlestkina E.K. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2014;4(3):236-244.
- Khlestkina E.K., Giura A., Röder M. S., Börner A. A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat. *Euphytica*. 2009;165:579-585.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Efremova T.T., Börner A., Shumny V.K. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat determined by microsatellite markers. *Plant Breeding*. 2004;123:122-127.
- Kim C., Guo H., Kong W., Chandnani R., Shuang L.S., Paterson A.H. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. *Plant Science*. 2016;242:14-22. DOI 10.1016/j.plantsci.2015.04.016.
- Kovacs M.I.P., Howes N.K., Clarke J.M., Leisle D. Quality characteristics of durum wheat lines deriving high protein from a *Triticum dicoccoides* (6b) substitution. *J. Cereal Science*. 1998; 27(1):47-51.
- Kunert A., Naz A.A., Dedeck O., Pillen K., Leon J. AB-QTL analysis in winter wheat: I. Synthetic hexaploid wheat (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides* × *T. tauschii*) as a source of favourable alleles for milling and baking quality traits. *Theor. Appl. Genet.* 2007; 115:683-695.
- Landjeva S., Korzun V., Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica*. 2007;156:271-296.
- Lau W.C.P., Rafii M.Y., Ismail M.R., Puteh A., Latif M.A., Ramli A. Review of functional markers for improving cooking, eating, and the nutritional qualities of rice. *Front. Plant Science*. 2015;6:832.
- Li G., He Z., Lillemo M., Sun Q., Xia X. Molecular characterization of allelic variations at Pina and Pinb loci in Shandong wheat landraces, historical and current cultivars. *J. Cereal Science*. 2008;47:510-517.
- Liu S., Rudd J.C., Bai G., Haley S.D., Ibrahim A.M.H., Xue Q., Hays D.B., Graybosch R.A., Devkota R.N., Amand P.S. Molecular markers linked to important genes in hard winter wheat. *Crop Sci.* 2014;54:1304-1321.
- Liu Y., He Z., Appels R., Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125:1-10.
- Ma D.Y., Yan J., He Zh., Wu L., Xia X.C. Characterization of a cell wall invertase gene TaCwi-A1 on common wheat chromosome 2A and development of functional markers. *Mol. Breeding*. 2012; 29:43-52.
- Martín-Fernández B., Costa J., Oliveira M.B.P.P., Lopez-Ruiz B., Mafra I. Screening new gene markers for gluten detection in foods. *Food Control*. 2015;56:57-63.
- Maystrenko O.I., Troshina A.V., Ermakova M.F. Chromosomal arm location of genes for flour quality in wheat using ditelosomic lines. Proc. 4th Intern. Wheat Genetics Symp. Missouri Agr. Exp. Sta., Columbia, Mo, 1973;51-56.
- McCartney C.A., Somers D.J., Lukow O., Ames N., Noll J., Cloutier S., Humphreys D.G., McCallum B.D. QTL analysis of quality traits in the spring wheat cross RL4452. AC Domain. *Plant Breeding*. 2006; 125:565-575.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat Available at:

- <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp> (accessed 10 November 2015).
- McLauchlan A., Ogonnaya F.C., Hollingsworth B., Carter M., Gale K.R., Henry R.J., Holton T.A., Morell M.K., Rampling L.R., Sharp P.J., Shariflou M.R., Jones M.G.K., Appels R. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Australian J. Agric. Res.* 2001;52: 1409-1416.
- Mesfin A., Froberg R., Anderson J.A. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. dicoccoides introgressed into hard red spring wheat. *Crop Sci.* 1999;39(2):508-513.
- Mitrofanova O.P. Wheat genetic resources in Russia: Current status and prebreeding studies. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2012;2:277-285.
- Moose S.P., Mumm R. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiol.* 2008;147:969-977.
- Morozova E.V., Pshenichnikova T.A., Simonov A.V., Shchukina L.V., Chistyakova A.K., Khlestkina E.K. A comparative study of grain and flour quality parameters among Russian bread wheat cultivars developed in different historical periods and their association with certain molecular markers. *Abstr. International Conference EWAC-EUCARPIA Cereals Section, Lublin, Poland, May 24-29, 2015*;11.
- Morris R., Schmidt J.W., Mattern P.J., Johnson V.A. Chromosomal location of genes for high protein in the wheat cultivar Atlas 66. *Proc. 4th Internat. Wheat Genetics Symp. Missouri Agric. Exptl. Sta., Columbia, 1973*;715.
- Nakamura T., Hoshino H., Hidaka S. Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem. Genet.* 1993; 31:75-86.
- Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome.* 2002;45: 1150-1156.
- Parker G.D., Chalmers K.J., Rathjen A.J., Langridge P. Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:238-245.
- Parker G.D., Chalmers K.J., Rathjen A.J., Langridge P. Mapping loci associated with milling yield in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breeding.* 1999;5:561-568.
- Parker G.D., Langridge P. Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breeding.* 2000;6(2):169-174.
- Paux E., Sourdille P., Mackay I., Feuillet C. Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding. *Biotechnol. Advances.* 2012;30:1071-1088.
- Peña R.J. Wheat for bread and other foods. In: *Bread Wheat. Improvement and Production*. FAO. 2002.
- Poland J., Endelman J., Dawson J., Rutkoski J., Wu S., Manes Y., Dreisigacker S., Crossa J., Sánchez-Villeda H., Sorrells M., Janink J.-L. Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *Plant Genome.* 2012;5:103-113.
- Ponzoni E., Breviario D., Mautino A., Giani S., Morello L.A. multiplex, bead-based array for profiling plant-derived components in complex food matrixes. *Analytic. Bioanalytic. Chem.* 2013;405:9849-9858.
- Prasad M., Kumar N., Kulwal P.L., Röder M.S., Balyan H.S., Dhaliwal H.S., Gupta P.K. QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2003;106:659-667. DOI 10.1007/s00122-002-1114-y.
- Pshenichnikova T.A., Khlestkina E.K., Shchukina L.V., Simonov A.V., Chistyakova A.K., Morozova E.V., Landjeva S., Karceva T., Börner A. Exploitation of Saratovskaya 29 (Janetzki Probat 4D*7A) substitution and derivative lines for comprehensive phenotyping and molecular mapping of quantitative trait loci (QTL). *EWAC Newsletter 2012, Proc. of the 15th International EWAC Conference, 7-11 November 2011, Novi Sad, Serbia, 2012*;19-22.
- Pshenichnikova T.A., Simonov A.V., Shchukina L.V., Morozova E.V., Chistyakova A.K., Börner A. Enlargement of the genetic diversity for grain quality in bread wheat through alien introgression. *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Yokohama, Japan. Eds: Yasunari Ogihara, Shigeo Takumi, Hirokazu Handa, 2015; 287-292.
- Ram S., Jain N., Shoran J., Singh R. Newframe shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2005;14:45-48.
- 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., Gupta P. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. *Plant Breeding.* 2013;132: 458-471.
- Rasheed A., Xia X., Yan Y., Appels R., Mahmood T., He Zh. Wheat seed storage proteins: Advances in molecular genetics, diversity and breeding applications. *J. Cereal Science.* 2014;60:11-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.01.020>
- Röder M.S., Huang X.-Q., Börner A. Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Funct. Integr. Genomics.* 2008;8:79-86. DOI 10.1007/s10142-007-0053-8.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-1354.
- Schena M., Sharon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270:467-470.
- Serdyukova Yu.S., Usenko N.I. Strategic priorities of russia-belarus integration in terms of food security issue. *Economic Social Changes: Facts, Trends, Forecast.* 2013;3(27):62-70.
- Shariflou M.R., Hassani M.E., Sharp P.J. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the Wx-D1 gene of wheat. *Plant Breeding.* 2001;120(2):121-124.
- Shariflou M.R., Sharp P.J. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breeding.* 1999;118(3):275-277.
- Simmonds N.W. The relation between yield and protein in cereal grain. *J. Science Food Agriculture.* 1995;67:309-315.
- Somers D.J., Kirkpatrick R., Moniwa M., Walsh A. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome.* 2003;49:431-437.
- Su Z.Q., Hao C.Y., Wang L.F., Dong Y.C., Zhang Z.Y. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:211-223.
- Sun H., Lu J., Fan Y., Zhao Y., Kong F., Li R., Wang H., Li S. Quantitative trait loci (QTLs) for quality traits related to protein and starch in wheat. *Progress Natural Science.* 2008;18:825-831.
- Tanksley S.D. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Reports.* 1983;1:3-8.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science biotechnology. *Nature Biotechnol.* 1989;7:257-264.
- Tarkowski C., Otlowska-Miazga D. Location of genes controlling the quantitative level of protein in kernels of winter wheat, Luna variety. *Genetica polonica.* 1976;17(3):319.
- Timonova E.M., Leonova I.N., Röder M.S., Salina E. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome. *Mol. Breeding.* 2013;31:123-136.
- Tranquilli G., Lijavetzky D., Muzzi G., Dubcovsky J. Genetic and physical characterization of grain texture-related loci in diploid wheat. *Mol. General Genet.* 1999;262:846-850.
- Tsilo T.J., Nygard G., Khan Kh., Simsek S., Hareland G., Chao Sh., Anderson J.A. Molecular genetic mapping of QTL associated with flour water absorption and farinograph related traits in bread wheat. *Euphytica.* 2013;194:293-302. DOI 10.1007/s10681-013-0906-2.
- Turner M., Mukai Y., Leroy P., Charef B., Appels R., Rahman S. The Ha locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses. *Genome.* 1999;42(6):1242-1250.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science.* 2006;314:1298-1301.

- Vishwakarma M.K., Mishra V.K., Gupta P.K., Yadav P.S., Kumar H., Joshi A.K. Introgression of the high grain protein gene Gpc-B1 in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding. *Curr. Plant Biol.* 2014;1:60-67.
- Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Mol. General Gen.* 1999; 261(3):463-471.
- Waga J., Skoczowski A. Development and characteristics of ω -gliadin-free wheat Genotypes. *Euphytica.* 2014;195:105-116.
- Wang L., Li G., Xia X., He Z., Mu P. Molecular characterization of Pina and Pinb allelic variations in Xinjiang landraces and commercial wheat cultivars. *Euphytica.* 2008;164:745-752.
- William H., Trethowan R., Crosby-Galvan E. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica.* 2007;157:307-319.
- Worzella W.W. The inheritance of quality in Trumbull and Michikof varieties of winter wheat. *J. Agr. Res.* 1934;49(8):705-714.
- Worzella W.W. Inheritance and interrelationship of components of quality, cold resistance and morphological characters in wheat hybrids. *J. Agr. Res.* 1942;65(11):501-522.
- Xu Y., Crouch J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science.* 2008;48:391-407.
- Yamamori M., Quynh N.T. Differential effects of Wx-A1, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2000;100:32-38.
- Zanetti S., Winzeler M., Feuillet C., Keller B., Messmer M. Genetic analysis of bread-making quality in wheat and spelt. *Plant Breeding.* 2001;120:13-19.
- Zhang F., Chen F., Wu P., Zhang N., Cui D. Molecular characterization of lipoxygenase genes on chromosome 4BS in Chinese bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2015; 128:1467-1479.
- Zhang X., Tian J.C. The color advantage of Chinese wheat with high whiteness and analysis of factors affecting color formation. *Scientia Agricultura Sinica.* 2008;41:347-353.
- Zheng W.Y., Wang F., Si H.Q., Zhang W.M., Yao D.N. Variations of LOX and PPO activities and carotenoid content as well as their influence on whole flour color in common wheat. *Sci. Agricultura Sinica.* 2013;46(6):1087-1094.

Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда

Е.Т. Ильницкая , М.В. Макаркина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», Краснодар, Россия

В последнее время все более важную роль приобретают ДНК-технологии, которые эффективно могут быть использованы для оптимизации селекции. Виноград *Vitis vinifera* L. – одно из древнейших и ценнейших культурных растений. В статье приведен обзор основных мировых достижений в области генетики и селекции винограда с периода секвенирования генома виноградного растения. Процесс создания новых форм винограда, как и всех культурных растений, базируется на использовании существующего генетического разнообразия. По этой причине проблема детального изучения генофонда рода *Vitis*: дикорастущих популяций и сортов, созданных человеком на протяжении длительной истории возделывания данной культуры, – с каждым годом становится все актуальнее. Геном винограда – четвертый из секвенированных ядерных геномов высших растений. Работами различных исследовательских коллективов был определен и картирован ряд генов и локусов количественных признаков виноградного растения, а также наборы ДНК-маркеров генов хозяйственно ценных признаков. Основные успехи достигнуты в изучении генов, определяющих устойчивость к наиболее вредоносным грибным патогенам *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*. Достижения в области генетического картирования и использование ДНК-маркеров в процессе традиционной селекции позволили уточнить генетический механизм бессемянности – важного признака в селекции столовых сортов винограда. Изучению генетического контроля содержания веществ, определяющих органолептические свойства вин, также был посвящен ряд работ. Все чаще находит применение маркер-ориентированная селекция (marker assisted selection, MAS). Маркеры, связанные с генами резистентности к болезням, в настоящее время используются для выбраковки восприимчивых семян на начальном этапе крупномасштабных селекционных программ, проводимых в Германии, Италии и США. Таким образом, успехи в молекулярной биологии винограда создают благоприятную среду для активного использования ДНК-маркерных технологий на этой культуре.

Ключевые слова: геном винограда; ДНК-маркеры; идентификация генов; молекулярное маркирование; маркерная селекция.

Application of DNA markers in molecular breeding and genetic studies of grapevine

E.T. Ilnitskaya , M.V. Makarkina

North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture, Krasnodar, Russia

DNA technology has increasingly become more and more important over last years. They can be used to improve the breeding of agricultural plants. Grapevine is one of the oldest and most important cultured plants. This article presents a review of the world's main achievements in grapevine genetics and marker-assisted selection after the *Vitis* genome sequence. The process of creating new forms of grapes, as well as all crops, is based on the use of existing genetic diversity. For this reason, the problem of a detailed study of the gene pool of the genus *Vitis*, wild populations and varieties created by men during the long cultivation history of this crop becomes more and more important every year. The genome of *Vitis vinifera* L. is the fourth sequenced nuclear genome of higher plants. A number of genes and quantitative trait loci were identified and mapped by various research groups, and so were sets of DNA markers for the genes of economically valuable traits. The genes for resistance to the most harmful fungal pathogens *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* are the most studied. Advancements in genetic mapping and the use of DNA markers in traditional breeding made it possible to refine the genetic mechanism of seedlessness, an important trait in the breeding of table grapes. The study of the genetic control of the content of substances that determine the organoleptic properties of wines has also progressed. Marker-assisted selection (MAS) is used in practice increasingly. Markers associated with disease resistance genes currently used for elimination of susceptible seedlings at the initial stage of large-scale breeding programs carried out in Germany, Italy and the United States. Thus, advances in molecular biology of grapevines creates a conducive situation for active use of DNA-marker technology in this culture.

Key words: grapevine genome; DNA markers; identification of genes; molecular marking; marker-assisted selection.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):528-536. DOI 10.18699/VJ16.163

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Il'nitskaya E.T., Makarkina M.V. Application of DNA markers in molecular breeding and genetic studies of grapevine. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):528-536. DOI 10.18699/VJ16.163

УДК 577.2:575.11:634.8.09

Поступила в редакцию 13.02.2016 г.

Принята к публикации 06.03.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

Виноград – одно из древнейших и ценнейших культурных растений. Семейство Виноградные (Vitaceae) объединяет несколько родов. Наиболее известен род *Vitis*, к которому, собственно, и относятся все основные возделываемые виды. Считается, что культивировать виноград начали путем одомашнивания диких популяций *Vitis vinifera* L. (This et al., 2006). Распространение сохранившегося дикого подвида культурного винограда (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris* Gmel.) во всей Европе резко сократилось, и в некоторых европейских странах он охраняется законом как исчезающий вид. Это сокращение было обусловлено двумя основными факторами: вредителями и болезнями, поражающими виноградники в Европе с момента их завоза во второй половине XIX в. из Америки, а также уменьшением естественной среды обитания под влиянием антропогенного воздействия (Arrigo, Arnold, 2007).

Селекция новых сортов винограда, как и всех культурных растений, основана на использовании генетического разнообразия – естественного и созданного человеком. С каждым годом все актуальнее становится проблема углубленного изучения генофонда рода *Vitis*, его видового биологического разнообразия, дикорастущих популяций и сортов, появившихся в результате длительной истории возделывания данной культуры. Понимание генетических и молекулярных особенностей существующего естественного разнообразия рода *Vitis* дает информацию и инструменты для генетического улучшения, необходимого для противостояния новым негативным факторам, с сохранением при этом необходимого качества ягод винограда (Martínez-Zapater, 2010).

Генетические маркеры играют исключительно важную роль в изучении наследственной конституции организма и особенно в оценке исходного и селекционного материала, поскольку облегчают контроль за включением желаемых признаков от родительских форм в создаваемые сорта и гибриды (Конарев, 1983). Наиболее перспективно использование маркерных систем на основе полиморфных последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК, что позволяет оценить генетический полиморфизм на уровне генома. В настоящее время существует огромное разнообразие методов анализа полиморфизма ДНК (Хлесткина, 2013). Выбор маркерной системы зависит от конкретных целей, стоящих перед исследователем.

Цель работы – обзор основных мировых достижений в области генетики и селекции винограда с применением ДНК-маркерных технологий. Представленный материал может быть применим в научно-исследовательских работах по изучению отечественного генофонда винограда.

Исследование генома винограда

Выполнение исследований, характеризующихся высокой степенью точности, изучение целевых участков генома стали возможны во многом благодаря главному событию в молекулярной генетике винограда – секвенированию генома *Vitis vinifera* (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007). Исследования проводились на сорте «Pinot Noir». Геном винограда – четвертый из секвенированных ядерных геномов высших растений (первые три – арабидопсис,

рис, тополь). Размер его относительно невелик: около 477 млн п. о. ($n = 19$). Для сравнения геном риса *Oryza sativa* – 430 Mb ($n = 12$).

В расшифрованном геноме обнаружено почти 30 тыс. генов. Значительная доля их – гены, участвующие в метаболизме терпенов и танинов – веществ, во многом определяющих вкус и аромат ягод и, соответственно, производимого вина. Также выявлено большое число кодирующих участков с высокой степенью гомологии к известным у других видов растений генам устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Значительная часть генов устойчивости сгруппирована в кластеры (Jaillon et al., 2007). В ходе секвенирования генома было определено около 2 млн SNP-сайтов, из которых 1,7 млн картированы, т. е. установлена их позиция в геноме. В одной из работ по идентификации микросателлитных последовательностей ядерного генома с длиной повтора более двух пар оснований было выявлено 26962 микросателлитных локусов и среди них определены SSR, содержащие три-, тетра- и пентаповторы (Cirigliani et al., 2008). Наличие большого количества идентифицированных ДНК-маркеров разных типов (SSR, SNP) с установленной позицией в геноме дает возможность выполнения работ по картированию генов, детерминирующих хозяйственно ценные признаки. Это же позволяет проводить достоверную идентификацию и ДНК-паспортизацию сортов и клонов винограда.

Идентификация генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки

Работами различных исследовательских коллективов был определен и картирован ряд генов и локусов количественных признаков (QTL) винограда, а также наборы ДНК-маркеров для идентифицированных генов. Основные успехи достигнуты в изучении генов, определяющих такие признаки, как устойчивость к грибным патогенам, а также показатели качества продукции (таблица).

Устойчивость к *Plasmopara viticola* (милдью). Заболевание милдью, одно из наиболее значимых грибных заболеваний для европейского виноградарства, вызывается биотрофным оомицетом *Plasmopara viticola*. Поиск и подбор генотипов, обладающих естественной устойчивостью к инфекции – актуальная задача селекции.

Сорта винограда *V. vinifera* в основном восприимчивы к милдью (Staudt, Kassemeyer, 1995; Cadle-Davidson, 2008), за редким исключением: например, в геноме сорта «Chardonnay» был выявлен локус *Rpv11* (Bellin et al., 2009). Генотипы, обладающие устойчивостью к милдью, относятся к видам винограда, происходящим из Северной Америки и Азии: *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *Muscadinia rotundifolia* и др. (Alleweldt, Possingham, 1988; Wan et al., 2007). Программы селекции направлены на то, чтобы интродуцировать гены, определяющие устойчивость к *P. viticola*, в генотипы *V. vinifera*.

На сегодняшний день более 13 QTLs устойчивости к *P. viticola* с главными и минорными эффектами локализованы на хромосомах 4, 5, 7, 8, 9, 12, 14, 17, 18 (Merdinoglu et al., 2003; Fischer et al., 2004; Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009; Marguerit et al., 2009; Moreira et

Гены, контролирурующие признаки растений винограда, их хромосомная локализация и ДНК-маркеры

Признак	Обозначение гена	Хромосома	Сцепленные ДНК-маркеры	Литературный источник		
Устойчивость к:						
<i>Agrobacterium sp.</i> (бактериальный рак)	<i>Rcg1</i>	15	<i>UDV-015</i> <i>9M3-3</i>	Kuczmog et al., 2012		
<i>Daktulosphaera vitifoliae</i> (филлоксеры)	<i>Rdv1</i>	13	<i>Gf13_9</i> <i>VMC8e6</i>	Zhang et al., 2009		
<i>Xylella fastidiosa</i> (болезнь Пирса)	<i>Pdr1</i>	14	<i>VMCNg3h8</i> <i>VVin64</i> <i>UDV-095</i> <i>VVIP26</i> <i>ctg1026876V</i> <i>MC2a5</i>	Riaz et al., 2006 Riaz et al., 2008		
			<i>Rpv1</i>	12	<i>VVib32</i>	Riaz et al., 2009 Merdinoglu et al., 2003
<i>Plasmopara viticola</i> (милдью)	<i>Rpv3</i>	18	<i>UDV-112</i> <i>UDV-305</i> <i>VMC7f2</i>	Welter et al., 2007 Bellin et al., 2009		
	<i>Rpv4</i>	4	<i>VMC7h3</i> <i>VMCNg2e1</i>	Welter et al., 2007		
	<i>Rpv5</i>	9	<i>VVio52b</i>	Marguerit et al., 2009		
	<i>Rpv6</i>	12	<i>VMC8G9</i>	Marguerit et al., 2009		
	<i>Rpv7</i>	7	<i>UDV-097</i>	Bellin et al., 2009		
	<i>Rpv8</i>	14	<i>Chr14V015</i>	Blasi et al., 2011		
	<i>Rpv9</i>	7	<i>CCoAOMT</i>	Moreira et al., 2011		
	<i>Rpv10</i>	9	<i>GF09-46</i>	Schwander et al., 2012		
	<i>Rpv11</i>	5	<i>VMD27</i> <i>CS1E104J11F</i> <i>VCHR05C</i>	Fischer et al., 2004 Bellin et al., 2009 Schwander et al., 2011		
			<i>Rpv12</i>	14	<i>UDV-014</i> <i>UDV-304</i> <i>rgvvin180</i> <i>UDV-370</i>	Venuti et al., 2013
			<i>Rpv13</i>	12	<i>VMC1G3.2</i>	Moreira et al., 2011
	<i>Erysiphe necator</i> (оидиум)	<i>Ren1</i>	13	<i>UDV-020</i> <i>VMC9h4-2</i> <i>VMCNg4e10.1</i>	Hoffmann et al., 2008	
		<i>Ren2</i>	14	<i>CS25</i>	Dalbo et al., 2001	
<i>Ren3</i>		15	<i>UDV-015b</i> <i>VViv67</i>	Akkurt et al., 2007		
<i>Ren4</i>		18	<i>VMC7f2</i> <i>SNPs</i>	Riaz et al., 2013 Mahanil et al., 2012		
			<i>Run1</i>	12	<i>VMC4f3.1</i> <i>VMC8g9</i>	Barker et al., 2005
<i>Run2</i> (<i>Run2.1</i> , <i>Run2.2</i>)		18	<i>VMC7f2</i> <i>VMCNg1e3VV</i> <i>In16</i>	Riaz et al., 2011		
<i>Guignardia bidwellii</i> (черная гниль)		<i>Rgb1</i>	14	<i>Gf14-42</i>	Rex et al., 2014	
	<i>Rgb2</i>	16	<i>VChr16c</i>	Rex et al., 2014		
<i>Xiphinema index</i> (нематода)	<i>Xir1</i>	19	<i>VMC5a10</i> <i>1N2R3b</i> <i>M4F3R</i>	Xu et al., 2008 Hwang et al., 2010		

Окончание таблицы

Признак	Обозначение гена	Хромосома	Сцепленные ДНК-маркеры	Литературный источник
Пол цветка	<i>Sex</i>	2	<i>VVMD34</i>	Lowe, Walker, 2006
			<i>VVib23</i>	Riaz et al., 2006
			<i>VVS3</i> <i>APT</i>	Dalbó et al., 2000 Fechter et al., 2012
			<i>SNP4C_1</i> <i>VVib23</i>	Battilana et al., 2013
Структура мякоти ягод	<i>Flb</i>	18	<i>VMC2A3</i>	Fernandez et al., 2006
Бессемянность	<i>Sdi</i>	18	<i>VMC6f11</i>	Arroyo-García, Martínez-Zapater, 2004
			<i>VMC7f2</i>	Cabezas et al., 2006
			<i>p3_VvAGL11</i> <i>SCC8</i>	Mejía et al., 2011 Doligez et al., 2002
Размер ягод	<i>Be size</i>	18	<i>SCC8</i>	Doligez et al., 2002
			<i>VMC7f2</i>	Cabezas et al., 2006 Mejia et al., 2007 Costantini et al., 2008
Цвет ягод	<i>Ufgt</i>	16	<i>UFGT</i>	Fischer et al., 2004
Начало созревания	<i>Ver</i>	16	<i>VMC1E11</i>	Fischer et al., 2004
Содержание				
монотерпенов и терпеноидов	<i>DXS</i>	5	<i>DXS1</i>	Battilana et al., 2009 Duchêne et al., 2009
			линалоола	10
10	<i>VrZAG64</i> <i>VMC3d7</i>	Duchêne et al., 2009		
2	<i>VVlo55</i>			
нерола, гераниола		10	<i>VrZAG64</i>	Duchêne et al., 2009
		1	<i>VVIm256</i> <i>VVin61</i>	

al., 2011; Schwander et al., 2012). Большинству из этих локусов присвоены генные символы (таблица).

Первым картированным геном устойчивости к милдью был *Rpv1*, расположенный на хромосоме 12 и происходящий от *M. rotundifolia* (Merdinoglu et al., 2003). От *M. rotundifolia* в хромосому 18 *V. vinifera* был интрогрессирован и другой ген, *Rpv2* (Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006). Позднее в хромосоме 18 в районе локализации гена *Rpv2* был картирован ген *Rpv3* (Fischer et al., 2004; Welter et al., 2007). Однако впоследствии было показано, что и гены устойчивости *Rpv2* и *Rpv3* находятся в различных районах хромосомы (Bellin et al., 2009). Исследование устойчивых сортов среди североамериканских представителей рода *Vitis*, обладающих геном *Rpv3*, выявило наличие семи консервативных гаплотипов (Di Gaspero et al., 2012).

Главный локус, *Rpv8*, объясняющий до 86 % фенотипического проявления признака устойчивости к милдью, был картирован на хромосоме 14 (Blasi et al., 2011). Ген *Rpv10* на хромосоме 9 был выявлен в сорте «Solaris», и было показано, что он определяет до 50 % наблюдаемой фенотипической изменчивости и унаследован от *V. amurensis* (Schwander et al., 2012). В этой же работе на хромосоме 5 сорта «Solaris» был описан ген *Rpv11* с минорным эффектом. Другими исследователями на хромосоме 14 был картирован QTL, также унаследованный от *V. amurensis* (Venuti et al., 2013). Этот QTL, определяющий 78,7 % фенотипической дисперсии, обозначили *Rpv12*. Однако есть предположения, что локусы *Rpv12* и *Rpv8* являются аллельными вариациями одного и того же гена. В непосредственной близости от *Rpv1* с использованием картирующей популяции «Moscato Bianco» × *V. riparia*

был идентифицирован локус *Rpv13* (Moreira et al., 2011). В ряде работ были описаны QTL на хромосомах 8, 12, 15 и 17, отличающиеся минорными эффектами в отношении патогена милдью (Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009; Marguerit et al., 2009; Zyprian et al., 2009; Blasi et al., 2011; Moreira et al., 2011).

Устойчивость к *Erysiphe necator* (оидиум). Заболевание оидиум вызывается аскомицетом *Erysiphe necator* (ранее *Uncinula necator*) (Braun et al., 2002), распространяется по воздуху путем конидиального спороношения. Поскольку инфекция не ограничивается конкретными условиями влажности и температуры, патоген представляет собой глобальную угрозу для виноградарства.

Генетическая устойчивость к оидиуму в основном наблюдается у северо-американской группы видов винограда, таких как *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea* и *V. labrusca*, и азиатской – *V. amurensis*, *V. bashinica*, *V. davidii*, *V. liubanensis*, *V. piasezkii* и *V. romanetii* (Alleweldt, Possingham, 1988; Wan et al., 2007).

В генотипах различных видов винограда были идентифицированы несколько локусов, отвечающих за устойчивость к оидиуму, и им присвоены символы *Run* (устойчивость к *Uncinula necator*) и *Ren* (*Erysiphe necator*). Первый из этих локусов, *Run1*, был определен и картирован на хромосоме 12 (Pauquet et al., 2001; Donald et al., 2002; Merdinoglu et al., 2003; Barker et al., 2005). Было установлено, что этот локус тесно связан с локусом *Rpv1* (Merdinoglu et al., 2003). В сорте винограда «Kishmish vatkana» *V. vinifera* на хромосоме 13 был идентифицирован локус *Ren1* (Hoffmann et al., 2008). S. Riaz с коллегами (2011, 2013) определили несколько локусов на хромосоме 18 в различных донорах устойчивости: *Run2.1* (*M. rotundifolia* «Magnolia»), *Run2.2* (*M. rotundifolia* «Trayshed») и *Ren4* (*V. romanetii* «C166-043»). Гены *Run2.1* и *Run2.2* были унаследованы от *M. rotundifolia*, но аллели, связанные с двумя фланкирующими маркерами, отличаются для сортов «Trayshed» и «Magnolia». *Run2.1*, *Run2.2* и *Ren4* на генетической карте находятся в той же области на хромосоме 18, что и *Rpv3*. М.А. Dalbó с коллегами (2001) исследовали локус устойчивости на хромосоме 14, позже названный *Ren2*, в популяции, полученной от скрещивания сортов винограда «Horizon» и «Illinois 547-1». Устойчивый родительский сорт «Illinois 547-1» представляет собой гибрид между *V. rupestris* и *V. cinerea*. Локус *Ren3* был идентифицирован на хромосоме 15 в сортах винограда «Regent» *V. vinifera* (Fischer et al., 2004; Akkurt et al., 2007; Welter et al., 2007) и «Villard Blanc» (Akkurt et al., 2007).

Вид *M. rotundifolia* характеризуется комплексной устойчивостью к оидиуму, антрактозу, серой гнили и др. (Olmo, 1986; Olien, 1990). На основе впервые созданной генетической карты *M. rotundifolia* сорта «Regale» с использованием 177 SSR-маркеров в группе сцепления 14 впервые был выявлен локус устойчивости к *E. necator* (*Ren5*), обуславливающий 58 % фенотипического проявления признака (Blanc et al., 2012). Примечательно, что *Ren5* находится в доверительном интервале *Rpv8* – локуса устойчивости к милдью из *V. amurensis* (Blasi et al., 2011). Сравнение генетических карт *V. vinifera* ($2n = 38$)

и *M. rotundifolia* ($2n = 40$) показало высокую коллинеарность их геномов.

Устойчивость к *Xylella fastidiosa* (болезнь Пирса). Одним из самых вредоносных заболеваний виноградной лозы в Северной Америке является болезнь Пирса (БП), вызываемая бактерией *Xylella fastidiosa*. Зараженные растения погибают от высыхания за несколько лет, после того как сосуды ксилемы блокируются деятельностью бактерий. Устойчивость к БП присутствует у аборигенных американских сортов вида *Vitis*, ген устойчивости (*PdR1*), расположенный в 14-й группе сцепления, был обнаружен у растений вида *V. arizonica* (Riaz et al., 2006). В 2009 г., исследуя две популяции виноградных растений, S. Riaz с коллегами отобрали для маркер-ориентированной селекции три маркера, *VVIP26*, *ctg1026876* и *VMC2a5*, сцепленных с геном *PdR1* (Riaz et al., 2009).

Устойчивость к *Daktulosphaera vitifoliae* (Phylloxera vastatrix Planch) (филлоксеры). Паразит был завезен из Америки в Европу в середине XIX в. С этого времени селекция винограда направлена на поиск и создание сортов, устойчивых к филлоксере. Корневая форма вредителя наносит ощутимый урон корнесобственным виноградникам не только вида *V. vinifera* L., но и сортам межвидового происхождения. Филлоксероустойчивые подвои, полученные от гибридизации американских диких видов винограда (преимущественно *V. riparia*), были успешно использованы для европейского виноградарства. Так, гибриды *V. berlandieri* × *V. riparia* являются признанными подвойными филлоксероустойчивыми сортами. Сорт «Bögneg» (гибрид *V. riparia* и *V. cinerea*) проявляет типичную гиперчувствительную реакцию с развитием местного некроза (Van Heeswijck et al., 2003), что проявляется как высокая или абсолютная устойчивость. J. Zhang с коллегами (2009), изучая популяцию, полученную от скрещивания *V3125* (*V. vinifera* «Schiava grossa») × «Riesling») × сорт «Bögneg», идентифицировали на генетической карте хромосомы 13 локус *Rdv1*. В этой же работе были определены два ДНК-маркера (*Gf13_9*, *VMC8e6*), которые сцеплены с геном *Rdv1* и могут быть использованы для маркер-ориентированной селекции.

Что касается признаков качества, физиологических показателей и особенностей развития растений винограда, в этом направлении значимых результатов пока не много, однако работы активно ведутся.

Пол цветка виноградного растения. Контроль пола растения регулируется одним локусом, обозначенным *Sex* и расположенным во второй группе сцепления (Dalbó et al., 2000). Маркеры, тесно связанные с геном *Sex*, определяющим пол цветка, важны в селекции винограда, особенно в селекционных программах, в которых гены устойчивости к болезням или вредителям передаются от диких двудомных видов *Vitis* в обоеполые растения культурного вида *V. vinifera*. Работами ученых были идентифицированы тесно сцепленные маркеры *VVTb23* и *VVS3* (Dalbó et al., 2000; Riaz et al., 2006; Battilana et al., 2013) и внутривидовые маркерные последовательности (Fechter et al., 2012). ДНК-маркеры могут быть использованы в маркер-ориентированной селекции на стадии проростков, для того чтобы определить

нежелательные растения, с мужским типом цветка, и экономить, таким образом, время и ресурсы, затрачиваемые в полевых экспериментах.

Структура мякоти ягод. Мутация бесплотности ягоды *flb* (fleshless berry), найденная в сорте винограда «Ugni Blanc» (*V. vinifera*), ухудшает дифференциацию и разделение внутренних мезокарпических клеток, которые образуют мякоть в ягодах. Эта мутация снижает вес плода в 10 раз без какого-либо влияния на фертильность или размер и количество семян. Для того чтобы определить характер наследования гена *flb* и положение его на молекулярно-генетической карте, были созданы картирующие популяции от скрещивания сортов «Chardonnay» и «Ugni Blanc» (Fernandez et al., 2006). Оценка фенотипического расщепления по типу завязи в потомстве выявила участие в контроле данного признака одного доминантного гена. Были определены связанные с данным геном микросателлитные маркеры, и локус *flb* был картирован в группе сцепления 18.

Бессемянность. Бессемянность винограда – полное отсутствие семян в ягоде или наличие только их зачатков. Существует два типа бессемянности: стеноспермокарпический – семя при опылении образуется, но на каком-то этапе прекращает свое развитие, величина и степень развитости рудиментов семян зависят от сортовых особенностей и условий формирования; партенокарпический – образование ягоды происходит без опыления, рудименты отсутствуют, ягоды при этом округлой формы и мелкого размера.

Бессемянность является одним из самых востребованных признаков столового винограда (*V. vinifera* L.), а разработка новых бессемянных сортов является дорогостоящим и трудоемким процессом. Так, сорт «Sultana» – один из основных источников признака стеноспермокарпического типа бессемянности в селекции столового винограда, в нем идентифицирован ген *Sdi* как отвечающий за проявление признака бессемянности (Doligez et al., 2002). Исследования данного вопроса определили наличие локуса-ингибитора развития крупных семян (*Sdi*) на хромосоме 18 с доминирующим эффектом бессемянности (Adam-Blondon et al., 2001; Kogras et al., 2009; Mahanil et al., 2012; Akkurt et al., 2013).

Ранее для использования в маркер-ориентированной селекции были разработаны четыре диагностических молекулярных маркера для выявления бессемянных стеноспермокарпических сортов винограда: два SCAR-маркера: SCC8 (Lahogue et al., 1998) и SCF27 (Mejía, Hinrichsen, 2003) и два микросателлитных ген-специфических маркера: VMC7F2 (Cabezas et al., 2006) и VMC6F11 (Arroyo-García, Martínez-Zapater, 2004). Несмотря на то что эти маркеры могут быть эффективны для идентификации генов, контролирующих бессемянность, слабое сцепление с локусом *Sdi* и отсутствие амплификации маркеров ограничивают их применение для сортов с различным генетическим происхождением (Adam-Blondon et al., 2001; Kogras et al., 2009).

Достижения в области генетического картирования и использование ДНК-маркеров в процессе традиционной селекции позволили уточнить генетический механизм бес-

семянности. Наиболее широко распространенная модель, предложенная для генетического контроля развития стеноспермокарпических семян, предполагает участие трех независимых и взаимодополняющих рецессивных генов, регулирующих доминирование локуса ингибирования развития семян (*SDI*) (Costantini et al., 2008). Исследованиями N. Mejía с коллегами (2011) в качестве основного функционального гена-кандидата для признака бессемянности был определен ген *VvAGL11*, относящийся к семейству D-lineage MADS-box. В качестве наиболее полезного маркера для селекционных программ на бессемянность был предложен STS-маркер *p3-VvAGL11*, который относится к регуляторной области *VvAGL11* и включает в себя участок (GAGA)_n. Однако разработавшие его авторы указали на необходимость проверки надежности данного маркера на более широком генофонде (Mejía et al., 2011). Маркер был проверен на коллекции из 101 сорта винограда различного генетического происхождения (Bergamini et al., 2013). Наибольшую эффективность для селекции на бессемянность, по мнению J. Li с коллегами (2015), несет совместное применение технологии культуры *in vitro* и маркер-ориентированной селекции.

Применение ДНК-маркеров в селекции винограда

Все более важную роль в последнее время приобретают ДНК-технологии, которые можно эффективно применять для оптимизации селекции, а именно: маркер-ориентированная селекция (marker assisted selection, MAS). Некоторые инструменты маркер-ориентированной селекции уже становятся популярными. Маркеры, связанные с генами резистентности к болезням, в настоящее время используются для отбраковывания восприимчивых сеянцев на начальном этапе крупномасштабных селекционных программ, проводимых в Германии, Италии и США (Di Gaspero et al., 2007; Eibach et al., 2007; Rias et al., 2008). Это один из немногих методов для ежегодного сканирования тысячи новых генотипов, так как выращивание многолетних древесных культур требует затраты времени, площадей и труда, применения сложных протоколов фенотипирования.

Использование маркеров для пирамидирования генов является одним из важных преимуществ маркер-ориентированной селекции, по сравнению с методами традиционной селекции. Так, одним из примеров успешного практического применения молекулярных маркеров в селекции винограда является работа немецких ученых по пирамидированию генов устойчивости в потомстве, полученном от скрещивания сортов «VHR 3082-1-42» и «Regent» (Eibach et al., 2007). VHR 3082-1-42 (*Muscadinia rotundifolia* × *Vitis vinifera*) несет гены *Run1*, определяющий устойчивость к оидиуму, и *Rpv1*, связанный с устойчивостью к милдью (Pauquet et al., 2001). Сорт «Regent», выпущенный в Германии в 1996 г. для промышленного возделывания, обладающий комплексной устойчивостью, несет гены *Rpv3* и *Ren3*, контролирующей устойчивость к милдью и оидиуму. Из потомства F₂ с помощью молекулярных маркеров к этим генам были отобраны образцы, содержащие оба гена устойчивости.

Сравнение фенотипических данных с результатами молекулярного анализа показало четкую зависимость между степенью устойчивости и наличием аллелей генов резистентности (Eibach et al., 2007).

Успехи в области молекулярной генетики винограда создают благоприятную среду для более активного использования ДНК-маркерных технологий и в российской науке. Секвенирование генома и клонирование генов позволяют создавать ДНК-маркеры для практической селекции и проводить научно-исследовательскую работу с применением молекулярно-генетических методов. Уже разработанные маркеры хозяйственно ценных генов могут быть апробированы на генофонде отечественных сортов, что раскроет эффективность конкретных маркерных систем для исследования образцов различного происхождения. Идентификация генов устойчивости к патогенам с помощью ДНК-маркеров в существующих коллекциях сортов и форм винограда сформирует более углубленные знания о накопленном генофонде и перспективах его использования в селекционном процессе.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983.
- Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(4/2):1044-1054.
- Adam-Blondon A.F., Lahogue-Esnault F., Bouquet A., Boursiquot J.M., This P. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. *Vitis*. 2001;40(3):147-156.
- Akkurt M., Cakir A., Shidfar M., Mutaf F., Söylemezoğlu G. Using seedlessness-related molecular markers in grapevine breeding for seedlessness via marker-assisted selection into Muscat of Hamburg × Sultanı progeny. *Turk. J. Biol.* 2013;37:101-105. DOI 10.3906/biy-1206-31.
- Akkurt M., Welter L., Maul E., Töpfer R., Zyprian E. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Mol. Breeding*. 2007;19(2):103-111. DOI 10.1007/s11032-006-9047-9.
- Alleweldt G., Possingham J.V. Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.* 1988;75:669-673. DOI 10.1007/BF00265585.
- Arrigo N., Arnold C. Naturalised *Vitis* rootstocks in Europe and consequences to native wild grapevine. *PLoS ONE*. 2007;2(6):e521. DOI 10.1371/journal.pone.0000521.
- Arroyo-García R., Martínez-Zapater J.M. Development and characterization of new microsatellite markers for grape. *Vitis*. 2004;43(4):175.
- Barker C.L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M.B., Bouquet A., Adam-Blondon A.F., Dry I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(2):370-377. DOI 10.1007/s00122-005-2030-8.
- Battilana J., Costantini L., Emanuelli F., Sevinci F., Segala C., Moser S., Grando M.S. The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(4):653-669. DOI 10.1007/s00122-008-0927-8.
- Battilana J., Lorenzi S., Moreira F.M., Moreno-Sanz P., Failla O., Emanuelli F., Grando M.S. Linkage mapping and molecular diversity at the flower sex locus in wild and cultivated grapevine reveal a prominent SSR haplotype in hermaphrodite plants. *Mol. Biotechnol.* 2013;54(3):1031-1037. DOI 10.1007/s12033-013-9657-5.
- Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gaspero G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine «Bianca» is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor. Appl. Genet.* 2009;120(1):163-176. DOI 10.1007/s00122-009-1167-2.
- Bergamini C., Cardone M.F., Anaclerio A., Perniola R., Pichierri A., Genghi R., Antonacci D. Validation assay of p3_VvAGL11 marker in a wide range of genetic background for early selection of stenospermocarp in *Vitis vinifera* L. *Mol. Biotechnol.* 2013;54(3):1021-1030. DOI 10.1007/s12033-013-9654-8.
- Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Mestre P., Merdinoglu D. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of *Ren5*, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(8):1663-1675. DOI 10.1007/s00122-012-1942-3.
- Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123(1):43-53. DOI 10.1007/s00122-011-1565-0.
- Braun U., Cook R.T.A., Inman A.J., Shin H.D. The taxonomy of the powdery mildew fungi. The powdery mildews: a comprehensive treatise. Eds R.R. Belanger, W.R. Bushnell, A.J. Dik, T.L.W. Carver. St Paul: APS Press, 2002:13-45.
- Cabezas J.A., Cervera M.T., Ruiz-García L., Carreño J., Martínez-Zapater J.M. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome*. 2006;49(12):1572-1585. DOI 10.1139/g06-122.
- Cadle-Davidson L. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Plant Dis.* 2008;92:1577-1584. DOI 10.1094/PDIS-92-11-1577.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M., Testolin R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biol.* 2008;8(1):127. DOI 10.1186/1471-2229-8-127.
- Costantini L., Battilana J., Lamaj F., Fanizza G., Grando M.S. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): from quantitative trait loci to underlying genes. *BMC Plant Biol.* 2008;8(38):17. DOI 10.1186/1471-2229-8-38.
- Dalbó M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Steinkellner H., Sefc K.M., Reisch B.I. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome*. 2000;43(2):333-340. DOI 10.1139/g99-136.
- Dalbó M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Wilcox W.F., Reisch B.I. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2001;126(1):83-89.
- Di Gaspero G., Cipriani G., Adam-Blondon A.F., Testolin R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers from R-gene candidates. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1249-1263. DOI 10.1007/s00122-007-0516-2.
- Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Diego Castellarin S., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124:227-286. DOI 10.1007/s00122-011-1703-8.
- Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith C., This P. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(5):780-795. DOI 10.1007/s00122-002-0951-z.
- Donald T.M., Pellerone F., Adam-Blondon A.-F., Bouquet A., Thomas M.R., Dry I.B. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2002;104:610-618. DOI 10.1007/s00122-001-0768-1.

- Duchêne E., Butterlin G., Claudel P., Dumas V., Jaegli N., Merdinoglu D. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-D-xylulose synthase gene colocalizes with a major quantitative trait loci for terpenol content. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(3):541-552. DOI 10.1007/s00122-008-0919-8.
- Eibach R., Zyprian E., Welter L., Töpfer R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 2007;46:120-124.
- Fechter I., Hausmann L., Daum M., Sörensen T.R., Viehöver P., Weishaar B., Töpfer R. Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*. *Mol. Genet. Genomics*. 2012;287(3):247-259. DOI 10.1007/s00438-012-0674-z.
- Fernandez L., Doligez A., Lopez G., Thomas M.R., Bouquet A., Torregrosa L. Somatic chimerism, genetic inheritance, and mapping of the fleshless berry (flb) mutation in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genome*. 2006;49(7):721-728. DOI 10.1139/G06-034.
- Fischer B.M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K.J., Töpfer R., Zyprian E.M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108(3):501-515. DOI 10.1007/s00122-003-1445-3.
- Hoffmann S., Di Gaspero G., Kovács L., Howard S., Kiss E., Galbács Z., Testolin R., Kozma P. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine «Kishmish vatkana» is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(3):427-438. DOI 10.1007/s00122-007-0680-4.
- Hwang C.F., Xu K., Hu R., Zhou R., Riaz S., Walker M.A. Cloning and characterization of *XiR1*, a locus responsible for dagger nematode resistance in grape. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(4):789-799. DOI 10.1007/s00122-010-1349-y.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Valle G. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. 2007;449(7161):463-467. DOI 10.1038/nature06148.
- Korpas A., Baranek M., Pidra M., Hradilik J. Behaviour of two SCAR markers for seedlessness within Central European varieties of grapevine. *Vitis*. 2009;48(1):33.
- Kuczog A., Galambos A., Horvath S., Martai A., Kozma P., Szegedi E., Putnoky P. Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(7):1565-1574. DOI 10.1007/s00122-012-1935-2.
- Lahogue F., This P., Bouquet A. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97(5-6):950-959. DOI 10.1007/s001220050976.
- Li J., Wang X.H., Wang X.P., Wang Y.J. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape. *Plant Cell Tiss. Org.* 2015;120(3):861-880. DOI 10.1007/s11240-014-0656-4.
- Lowe K.M., Walker M.A. Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) × Riparia Gloire (*Vitis riparia*). *Theor. Appl. Genet.* 2006;112:1582-1592. DOI 10.1007/s00122-006-0264-8.
- Mahanil S., Ramming D., Cadle-Davidson M., Owens C., Garris A., Myles S., Cadle-Davidson L. Development of marker sets useful in the early selection of *Ren4* powdery mildew resistance and seedlessness for table and raisin grape breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(1):23-33. DOI 10.1007/s00122-011-1684-7.
- Marguerit E., Boury C., Manicki A., Donnart M., Butterlin G., Némorin A., Decroocq S. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118(7):1261-1278. DOI 10.1007/s00122-009-0979-4.
- Martínez-Zapater J.M., Carmona M.J., Díaz-Riquelme J., Fernández I., Lijavetzky D. Grapevine genetics after the genome sequence: Challenges and limitations. *Australas. J. Grape Wine Res.* 2010;16(s1):33-46. DOI 10.1111/j.1755-0238.2009.00073.x.
- Mejía N., Gebauer M., Muñoz L., Hewstone N., Muñoz C., Hinrichsen P. Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless × seedless table grape progeny. *Am. J. Enol. Viticult.* 2007;58(4):499-507.
- Mejía N., Hinrichsen P. A new, highly assertive scar marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding. *Acta Horticulturae: Proc. the 8th Int. Conf. on Grape Genetics and Breeding*. 2003;603:559-564. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.603.74.
- Mejía N., Soto B., Guerrero M., Casanueva X., Houel C., de los Ángeles Miccono M., Ramos R., Le Cuniff L., Boursiquot J.-M., Hinrichsen P., Adam-Blondon A.-F. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biol.* 2011;11:57-18. DOI 10.1186/1471-2229-11-57.
- Merdinoglu D., Wiedeman-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty S., Butterlin G., Greif C. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *ISHS Acta Horticulturae: VIII Int. Conf. on Grape Genetics and Breeding*. Hungary, Kecskemet. 2003;2:451-456. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.603.57.
- Moreira F.M., Madini A., Marino R., Zulini L., Stefanini M., Velasco R., Grando M.S. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis spp.*) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genet. Genomes*. 2011;7(1):153-167. DOI 10.1007/s11295-010-0322-x.
- Olien W.C. The muscadine grape: Botany, viticulture, history and current industry. *Hort Sci.* 1990;25:732-739.
- Olmo H.P. The potential role of (*Vinifera* × *Rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Experientia*. 1986;42:921-926. DOI 10.1007/BF01941769.
- Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.-F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker aided selection. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103:1201-1210. DOI 10.1007/s001220100664.
- Rex F., Fechter I., Hausmann L., Töpfer R. QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock «Börner» (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(7):1667-1677. DOI 10.1007/s00122-014-2329-4.
- Riaz S., Boursiquot J.M., Dangl G.S., Lacombe T., Laucou V., Tenschler A.C., Walker M.A. Identification of mildew resistance in wild and cultivated Central Asian grape germplasm. *BMC Plant Biol.* 2013;13(149):21.
- Riaz S., Krivanek A.F., Xu K., Walker M.A. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, *PdR1*, and *Sex* on an extended genetic map of *Vitis rupestris* × *V. arizonica*. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113(7):1317-1329. DOI 10.1007/s00122-006-0385-0.
- Riaz S., Tenschler A.C., Graziani R., Krivanek A.F., Ramming D.W., Walker M.A. Using marker-assisted selection to breed Pierce's disease-resistant grapes. *Am. J. Enol. Viticult.* 2009;60(2):199-207. DOI 10.1007/s00122-010-1511-6.
- Riaz S., Tenschler A.C., Ramming D.W., Walker M.A. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122(6):1059-1073. DOI 10.1007/s00122-010-1511-6.
- Riaz S., Tenschler A.C., Rubin J., Graziani R., Pao S.S., Walker M.A. Fine-scale genetic mapping of two Pierce's disease resistance loci and a major segregation distortion region on chromosome 14 of grape. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117(5):671-681. DOI 10.1007/s00122-008-0802-7.
- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(1):163-176. DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
- Schwander F., Eibach R., Zyprian E., Töpfer R. Localisation and fine-mapping of the downy mildew resistance locus *Rpv10* in grapevine. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut*. 2011;162:23.

- Staudt G., Kassemeyer H.H. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis species*. *Vitis*. 1995;34:225-228.
- This P., Lacombe T., Thomas M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* 2006; 22(9):511-519. DOI 10.1016/j.tig.2006.07.008.
- Van Heeswijk R., Bondar A., Croser L., Franks T., Kellow A., Powell K. Molecular and cellular events during the interaction of phylloxera with grapevine roots. *Proc. Phylloxera Infested Vineyards*. Eds E.H. Rühl, J. Schmid. *Acta Hort.* 2003;617:13-15. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.617.1.
- Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., Pruss D., Skolnick M. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1326. DOI 10.1371/journal.pone.0001326.
- Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Di Gaspero D. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *PLoS ONE*. 2013;8(4):1-7. DOI 10.1371/journal.pone.0061228.
- Wan Y., Schwaninger H., He P., Wang Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis*. 2007;46:132-136.
- Welter L.J., Göktürk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E.M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol. Breeding*. 2007;20(4):359-374. DOI 10.1007/s11032-007-9097-7.
- Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Schneider C., Coste P., Onimus C., Dumas V., Merdinoglu D. Resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*: genetic analysis and use of molecular markers for breeding. *Proc. 5th Int. Workshop on Grapevine Downy Mildew and Powdery Mildew*. 2006:18-23.
- Xu K., Riaz S., Roncoroni N.C., Jin Y., Hu R., Zhou R., Walker M.A. Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(2):305-311. DOI 10.1007/s00122-007-0670-6.
- Zhang J., Hausmann L., Eibach R., Welter L.J., Töpfer R., Zyprian E.M. A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* «Schiava grossa» × «Riesling») × rootstock cultivar «Börner» (*Vitis riparia* × *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(6):1039-1051. DOI 10.1007/s00122-009-1107-1.
- Zyprian E.M., Welter L.J., Akkurt M., Ebert S., Salakhutdinov I., Gokturk-Baydar N., Eibach R., Topfer R. Genetic analysis of fungal disease resistance in grapevine. *Acta Hort.* 2009;827:535-538. DOI 10.17660/ActaHortic.2009.827.93.



Genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture

D. Grauda¹, K. Žagata¹, G. Lanka¹, V. Strazdina², V. Fetere², N. Lisina¹, N. Krasnevska¹, O. Fokina¹, A. Mikelsone¹, R. Ornicans¹, I. Belogrudova¹, I. Rashal¹

¹ Institute of Biology, University of Latvia, Salaspils, Latvia

² Stende Research Centre of the Institute of Agricultural Resources and Economics, Latvian University of Agriculture, Stende, Latvia

The study of genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture method from hybrids involved in the Latvian wheat breeding programme was performed. Flow cytometry was used to test ploidy of 3×10^3 cells of each green plant-regenerant, and universal retrotransposon based iPBS (inter primer binding sites) method were used to establish genetic diversity of plants-regenerants. Progenies of 13 genetically distant hybrids were involved in the study. Most of plants-regenerants have leaves with mixoploid cells. Seeds were formed only by plants-regenerants that had cells with ($2n = 6x$) ploidy. Majority of fertile plants-regenerants have more than 40 % of hexaploid ($6x$) cells. The percentage of $6x$ cells in plants-regenerants and diversity in cell ploidy demonstrated association with mother plant (hybrid) genotype. Percent of spontaneous diploidization was also genotype-dependent. In this experiment colchicine treatment had no significant influence on outcome of fertile plants-regenerants. New dominant allele in a hybrid plant was found in comparison with both parents what indicated possible retrotransposon moving. Genetic diversity of the plants-regenerants obtained in anther culture is a combination of parent's allele segregation and somaclonal variation.

Key words: anther culture; DH-lines; wheat breeding; ploidy; flow cytometry; iPBS.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Грауда Д., Жагата К., Ланка Г., Страздиня В., Фетере В., Лисина Н., Красневска Н., Фокина О., Микельсоне А., Орницанс Р., Белогрудова И., Рашаль И. Генетическое разнообразие растений-регенерантов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), созданных методом культуры пыльников. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):537-544. DOI 10.18699/VJ16.176

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Grauda D., Žagata K., Lanka G., Strazdina V., Fetere V., Lisina N., Krasnevska N., Fokina O., Mikelsone A., Ornicans R., Belogrudova I., Rashal I. Genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):537-544. DOI 10.18699/VJ16.176

УДК 633.111:581.1:575.2

Поступила в редакцию 06.06.2016 г.

Принята к публикации 20.07.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

Генетическое разнообразие растений-регенерантов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), созданных методом культуры пыльников

Д. Грауда¹, К. Жагата¹, Г. Ланка¹, В. Страздиня², В. Фетере², Н. Лисина¹, Н. Красневска¹, О. Фокина¹, А. Микельсоне¹, Р. Орницанс¹, И. Белогрудова¹, И. Рашаль¹

¹ Латвийский университет, Институт биологии, Саласпилс, Латвия

² Стендский исследовательский центр Института сельскохозяйственных ресурсов и экономики, Латвийский сельскохозяйственный университет, Стенде, Латвия

Изучено генетическое разнообразие растений-регенерантов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), которые созданы методом культуры пыльников из гибридов, используемых в селекции этой культуры в Латвии. Метод проточной цитометрии применяли для определения пloidности каждого зеленого растения-регенеранта. В свою очередь, универсальным iPBS (inter primer binding sites) методом, основанном на анализе характерных последовательностей ретротранспозонов, определяли генетическое разнообразие этих растений. Анализу подвергали потомство 13 гибридов различного происхождения. В листьях большинства растений были миксопloidные клетки. Семена дали только растения, имеющие клетки с пloidностью $2n = 6x$. Большинство фертильных растений содержало в листьях более чем 40 % гексапloidных ($6x$) клеток. Доля гексапloidных клеток и их распределение по пloidности зависели от генотипа материнского гибридного растения. Доля спонтанной диплоидизации также зависела от генотипа растения. В описываемом эксперименте колхицинирование не оказало достоверного влияния на выход фертильных растений. У одного гибридного растения обнаружена новая доминантная аллель, отсутствующая у обоих родителей, что указывает на возможное передвижение ретротранспозонов. Генетическое разнообразие растений-регенерантов, созданных методом культуры пыльников, вызвано как расщеплением родительских аллелей, так и соматоклональной изменчивостью.

Ключевые слова: культура пыльников; ДГ-линии; селекция пшеницы; пloidность; проточная цитометрия; iPBS.

Wheat occupies the largest part of all cropland and continues to be the most important type of whole-grain food for humans all over the world. In Latvia, last years the main cereal crops are spring and winter wheat. Wheat breeding in the country continues since 1922. In Latvia, main wheat crop is common wheat *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$) (Goncharov, 2002). The current breeding task is aimed to create new winter and spring wheat varieties adapted to conventional and organic management with grain quality corresponding to modern food industry requirements. For this purpose both traditional and biotechnology methods are applied. Different plant tissue culture methods are widely exploited to speed up breeding time of many crops and can be used during all breeding stages: for obtaining breeding source material, selection of best plants/lines and the fast genotype propagation. Involving doubled haploid (DH) lines in the breeding process is recognized as an appropriate approach especially in conditions of mid-size breeding institutions both to speed up time of obtaining of new varieties and decrease labour and technical resources. Advantages of using DH lines are well known: during a single generation not segregating lines homozygous in all loci are created what provides ability for true evaluate of breeding material in a rather short time. Additionally, novel important gene alleles could be quickly involved in new varieties. Usually, by involving DH technique creating of new varieties is shortening for 3–5, in some cases even more years (Grauda et al., 2010; Tadesse, 2012). In Latvia, new spring wheat variety 'Robijs' was created from a DH line, initiated by anther culture, only during 7 years (Grauda et al., 2009).

To produce DH lines such approaches, as hybridisation with haploproducer, as well as DH creating from pollen, anthers and ovarium *in vitro* cultures, are used. DH lines can be obtained by autopolyploidy or induced polyploidy as mitotic polyploidization, which is based on the doubling of chromosome set of somatic tissues of haploid plants (Ramsey, Schemske, 1998) and resulted in two (or more) pairs of homologous chromosomes. Production of DH plants by anthers culture is the most significant method used in the wheat breeding (Kasha, Maluszynski, 2003; Belchev et al., 2004; Grauda et al., 2009, 2010; El-Hennawy et al., 2011). Effectiveness of anther culture is found to be influenced by genotype of used hybrids, donor plant growth conditions, the developmental stage of microspores, spikes pre-treatment, and media components (Kasha, Maluszynski, 2003). Different investigations have been carried out to clarify mode of inheritance of microspore regeneration capacity in anther culture and *de novo* shoot organogenesis (Torp, Hansen, 2001; Xynias et al., 2001; Kasha, Maluszynski, 2003; Zamani et al., 2003; Jacquard et al., 2009; Ferrie, Caswell, 2010; Duclercq et al., 2011; El-Hennawy et al., 2011; Rubtsova et al., 2012) and to find out the ways to increase percentage of green plants-regenerants. Till now, the hybrid genotype is still the main limiting factor of androgenesis in tissue culture and therefore it is also the limiting factor for successful obtaining fertile plants-regenerants with stable diploid ($2n$) chromosome set as a starting plant of DH line.

Spontaneous doubling rate in wheat depends on the genotype and in different experiments varied from 0 to 68 % of the obtained plants-regenerants (Barnabás, 2003; Grauda et al., 2010, 2014; El-Hennawy et al., 2011). Colchicine is the

most successful agent used for doubling of chromosome set. Colchicine inhibits spindle formation during mitosis and disturbs normal polar segregation of sister chromatids, what leads to doubling of chromosome number (Levan, 1938). Colchicine treatment in various concentrations was successfully applied during cultivation both anthers and plants-regenerants (Barnabás et al., 1991; Chen et al., 1994; Hansen, Andersen, 1998; Soriano et al., 2007). Nevertheless, the question about the most effective time and concentration of using the colchicine for anther culture method is still open. An important step to evaluate colchicine influence is determination of cell chromosome number. Use flow cytometry (FCM) makes the process of determination of ploidy of plants-regenerants quick and efficient. For this purpose DNA is bound with fluorescent dye and relative laser initiated fluorescence are recorded. The large number of cells can be evaluated in a very short time and therefore results are statistically significant and represent a whole population. Resulting relative fluorescence is calculated on data of measurement of fluorescence of 1000 cells as a minimum (Doležel et al., 1991; Galbraith, 2010). Genetic diversity of DH lines obtained from the same hybrid is usually associated with combinative variability based on parental plants genotypes.

Use of pollen or anther culture for DH production related to high level of cell stress during of different stages of *in vitro*: immature pollen pre-treatment, callus initiation and cultivation. As a result of cell stress during *in vitro* cultivation, so called somaclonal variation (Smith, Park, 2002; Khan et al., 2008) could be observed. Direct use of somaclonal variation in plant breeding is limited by a lot of factors: they are unpredictable, variation may be hereditary or epigenetic (Smith, Park, 2002). Moreover, somaclonal changes cannot be received for all traits, most of them are negative, new features are very rare. But on the other hand, somaclonal variation has benefits – changes may affect agronomically important characteristics, and finally, in *in vitro* conditions could be selected biotic and abiotic stress resistant genotypes. Frequency of somaclonal variation is related to genotype, type of explants, cultivation media, and time of cultivation *in vitro* (Jain et al., 1998).

Some authors (Kalendar, Schulman, 2006; Bairu et al., 2011) consider changes of activity and transposition of mobile genetic elements, including retrotransposons, to be the main cause of somaclonal variation. Retrotransposons are found in all plant genomes. In wheat retrotransposons compose till 68 % of whole genome (Li et al., 2004). Retrotransposons are repetitive sequences integrated between functional genes in the noncoding regions (Kubis et al., 1998; Bennetzen, 2000). Retrotransposons are source of spontaneous mutations, activity of retrotransposons associated with plant cell stress (Casacuberta, Santiago, 2003; Kalendar et al., 2010). After cell polyploidization transpositions are most common genetic alteration, hence retrotransposon-based methods are most effective for studying genetic diversity caused by somaclonal variation. Some authors (Kalendar, Schulman, 2006; Bairu et al., 2011) suggest that activity of transposons, including retrotransposons, is a base of somaclonal variation.

The goal of this study was evaluation of genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture from hybrids involved in Latvian wheat breeding programme. By the reasons mentioned above a

Table 1. Hybrids used for obtaining plants-regenerants by anther culture

Hybrid designation	Cross combination	Type
A	Eminent/Uffo	Spring
B	Sarnuko//Bastian/Drifler	Spring
C	Uffo//Jasna/Jota	Spring
D	Bombona/Fasan	Spring
E	Compliment/Contact	Winter
F	CPBT W 143/Ada	Winter
G	Nic99-3009B/Raduga/Galahad	Winter
H	Schara/Nic04-4106B	Winter
I	Premjera/Nic04-3241A	Winter
J	Sepstra/Nic04-4106B	Winter
K	Fantazia/Olivin	Winter

universal retrotransposon based iPBS (inter primer binding sites) method was chosen for the study. The method developed by R. Kalendar et al. (2010) allows revealing the high level of genetic diversity and it is cost and labour effective. The method was successfully used for investigation of genetic diversity of several species (Kalendar et al., 2010; Smýkal et al., 2011; Grauda et al., 2014; Kalendar, Schulman, 2014; Kļaviņa et al., 2014).

Materials and methods

Plant material

Spring and winter common wheat *Triticum aestivum* L. F₁ and F₂ hybrids created at the Research Centre of the Institute of Agricultural Resources and Economics (former State Stende Cereals Breeding Institute, Latvia) were used for DH lines obtaining (Table 1). Donor plants were grown in greenhouse (+17 to +20 °C at night, +25 to +30 °C day, humidity ~70 %) or in room conditions (+20±2 °C, humidity ~40 %, 16 hours photoperiod). Three weeks after sowing seedlings of winter genotypes were vernalised at +4 °C for 8 weeks. Spikes of both wheat types were collected when most microspores were in the early or mid-uniculate stage. The developmental stage of microspores was determined by squashing in acetic carmine on a glass slide (Jacquard et al., 2003; Grauda et al., 2014).

Establishing of anther culture and obtaining plants-regenerants

Collected spikes were maintained at +4 °C for two weeks. Spikes were sterilised with 50 % commercial bleach (4 % of hypochlorite content) water solution for 17 minutes, and then rinsed 4 times with deionised and autoclaved water (Grauda et al., 2005). Anthers were separated from spikes and, in equivalent amounts, put on liquid induction medium AMC (Quinn, Keough, 2002) with 2.5 mg/l CuSO₄ × 5H₂O (Grauda et al., 2005). Petri dishes with anthers were maintained in a growth chamber at +29 °C in dark conditions. After four weeks of cultivation obtained embryos about 2 mm in diameter were transferred onto regeneration medium 190-2 (Kunz et al., 2000). Embryos were cultivated under light (+24 °C, 16 hours photoperiod, light intensity 3000 lx). When embryos started

to develop green plantlets, they were transferred on rooting medium: MS (3 % sucrose, 0.6 % agar) with 1 g/ml activated charcoal. Plantlets were grown under light (+24 °C, 16 hours photoperiod, light intensity 3000 lx).

After 2–4 weeks of cultivation on rooting medium the plantlets with developed leaves and roots were transferred into autoclaved mixture of soil and sand (1 : 1) and grown in a growing room (+20±2 °C, humidity ~40 %, 16 hours photoperiod). For the first days plantlets were covered with glass jars to maintain high level of humidity.

Colchicine treatment

For the doubling of chromosome set the plantlets with well-developed leaves and roots were chosen. Plants-regenerants obtained from each cross combination of spring wheat hybrids (Table 1, A–D) were split randomly into two equal groups – plants regenerants which were treated with colchicine, and another part which continued grown without colchicine treatment (control). For winter wheat control was established for two hybrid combinations (Table 1, E and F).

Roots of plants-regenerants were immersed in 0.2 % colchicine solution for 4 hours. Then the plants were rinsed with water, planted back into soil and cultivated in a growing room (+20±2 °C, humidity ~40 %, 16 hours photoperiod). Spring wheat plants-regenerants were grown in the mentioned conditions till maturity. Winter wheat plants-regenerants after 3 weeks of treatment by colchicine were transferred to a growth chamber (+1 to +7 °C, dim-light) for vernalisation. After 8 weeks of vernalisation survived plantlets were moved to a growing room (+20±2 °C, humidity ~40 %, 16 hours photoperiod) and grown till maturity.

Ploidy determination

In stage of tillering the second leaf from each plant-regenerant was collected for ploidy determination by flow cytometry. Collected plant leaves (approximately 0.5 cm²) were prepared using CyStain PI absolute P reagent kit (Sysmex Partec GmbH., Germany) according to the manufacturer protocol. Leaves were chopped by a razor blade in petri dishes, then added 500 µl of the extraction buffer solution per sample, and after 90 seconds were filtered by Partec 50 µm CellTrics

disposable filter. Samples were coloured with staining buffer solution with PI (propidium iodide) and RNase in amount of 2.0 ml and incubated in dark conditions for 60 minutes. BD FACSJazz® cell sorter (BD Biosciences, USA) with flow cytometer function was used to determine ploidy of plant cells. The device was equipped with 100 µm nozzle and used phosphate-buffered saline (BD Pharmingen™ PBS, BD Biosciences, USA) as a sheath fluid. Cell nucleus counting events were triggered by forward-scattered signal. The excitation of the cell fluorescence was made by 488 nm Coherent Sapphire Solid State (blue) laser. The fluorescence emission was measured at 585 nm (bandwidth 29 nm). Before measurements, flow cytometer was calibrated using Sphero™ rainbow calibration particles (3.0–3.4 µm, BD Biosciences, USA) in phosphate buffered saline (PBS). The calibration was considered as successful if the coefficient of variance (CV) of the relative fluorescence of calibration particles did not exceed 3 %. Cell nucleus counts were gated by the intensity in fluorescence channel to include 95–99 % of target nucleus. The intensity of fluorescence was expressed in arbitrary units and analysed in logarithmic scale, used through the whole research. No less than 3×10^3 gated cell nucleus were analysed from each sample. Plants of wild wheat species *Triticum urartu* (2x) and *T. durum* (4x), and two common wheat (*T. aestivum*) varieties (6x) were used for establishing of relative fluorescence reference system.

Estimation of genetic diversity of plants-regenerants

Ten iPBS primers (Kalendar et al., 2010; Kalendar, Schulman, 2014) that showed high level of polymorphism of many organisms were tested on the preliminary sample set of wheat. Criteria for further analysing of diversity of plants-regenerants was the difference in loci produced by mother plants of used hybrids (varieties 'Olivin' and 'Fantasia'). Primers showing at least one different locus between mother plants were selected for analysing of all plant material for further studies. At first stage homogeneity of mother plants on selected loci were tested, then selected primers were used for analysing of plants-regenerants. For genetic analysis DNA was extracted from dried leaves using NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, mn-net.com) and standard protocol for plants. After homogenization of dried plant material lysis buffer PL2 was used (protocol part 2B), incubation time – 60 min. Extracted DNA was examined for quality test by 0.7 % agarose gel electrophoresis at 80 V for one hour, DNA quality also was detected by spectrophotometer. DNA amplification was performed in Gene Amp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) under the following conditions: denaturation 95 °C/3 min, then 30 cycles and three-steps PCR process: (denaturation at 95 °C/30 s; annealing at 50 °C/40 s; extension at 68 °C/60 s) and the final annealing temperature was 72 °C for 10 min. The concentration of DNA used in PCR reactions was 30–100 mcg/ml and was quantified using Eppendorf Biophotometer. The final concentration of reagents in PCR mixture was: 1xDream Taq Buffer (Fermentas), 200 µM dNTPs (Fermentas), 1 µM primer, 2.5 U per 25 µl DreamTaq polymerase (Fermentas) and 0.06 U per 25 µl Pfu DNA polymerase (Fermentas). PCR products were visualized by 1.7 % agarose gel electrophoresis with 25 × 10 gel track, in 1 X TAE buffer at 40 V for 17 hours. Gel was dyed for 40 min-

utes in deionized water with 20 µl/L 10 % water solution of ethidium bromide and rinsed for 10 minutes in deionized water. After visualization the agarose gel was documented with digital camera (Yılmaz et al., 2012).

Data processing

Generalized linear model (GLMs) was applied to detect factors that influence seed production. Logistic and Poisson distributions were used in the GLM analysis (Quinn, Keough, 2002). The best model was chosen based on Akaike's Information Criterion (AIC) values, and variance. The model with lowest AIC value was chosen. Groups of two hybrids offspring, which showed biggest difference in seed production (the greatest seed existence among the lines, and complete seed absence), were compared with t-test to determine the difference of percentage of hexaploid cells. Statistical calculations were made using R v. 3.2.3 and MS Excel software.

Results

Direct influence of cells ploidy on the formation of green plants-regenerants was not found. The loss of wheat plant-regenerants during transfer from *in vitro* culture to soil was about 10 %, and no effect of genotype or cell ploidy was observed. All evaluated wheat plants-regenerants have cells of different ploidy, including diploid ($2n = 6x$) cells (Fig. 1, b), nevertheless 60 % of those were mixoploids with wide spectrum of cells with different ploidy (from 2x till 6x) (Fig. 1, c and d).

Even plants-regenerants produced from the same hybrid combination had different proportions of cells with various ploidy, including different proportion of cells with 6x. This presented, in general, very high genetic diversity within and between offspring of different hybrids (Fig. 2). Only presence of 6x cells ensures the development of seeds, the plants-regenerants without hexaploid cells in all cases were sterile regardless of cell ploidy (2x, 3x, or 4x). The presence of 6x ploidy cells were found in all fertile plants-regenerants and ranged from 8 % till 85 %. On the other hand presence of 6x cells is not a guaranty of plant seed formation (Fig. 2, a, hybrid B). Several plants-regenerants (Fig. 2, F) had seeds at presence of even very small (less than 20 %) 6x cell percentage. Nevertheless, in the next generation offspring of such plants formed stable DH lines with cell ploidy $2n = 6x$. Usually fertile plants-regenerants had more than 40 % of hexaploid cells. As exception can be mentioned, that a plant-regenerant with proportion of cells with 6x ploidy more than 70 % (Fig. 2, a, hybrid A) did not produce seeds, although other regenerant from the same hybrid with only 32 % of 6x cells was fertile.

Comparison of spring and winter wheat types pointed out similar tendencies. All evaluated plants-regenerants of winter samples presented on Fig. 2 (hybrids E and F) were mixoploids before colchicine treatment and already contained cells with ploidy 6x, from them hybrid E produced only sterile plants-regenerants. Plants-regenerants of other winter wheat hybrids after colchicine treatment were partly fertile (Fig. 3, hybrids G–K), all of them also were mixoploid with different content of 6x cells before the treatment. The level of fertility depending of hybrid combination ranged in this set from 33 % (Fig. 3, hybrid H) till 64 % (Fig. 3, hybrid I).

The comparison with the control both in spring and winter wheat showed that colchicine treatment slightly enhanced percentage of hexaploid cells only for small part of plants-regenerants (data not shown). The influence of colchicine treatment on fertility of plants-regenerants was not observed.

Data analysis by generalized linear model (GLM) method allowed establishing factors that determine seed formation in plants-regenerants (Table 2). GLM models explaining presence of seeds and percentage of hexaploid cells in linkage with genotype and colchicine treatment. Percentage of hexaploid cells ($p < 0.001$) and genotype ($p < 0.01$) are significantly associated with seed formation. Statistically significant ($p < 0.001$) influence of genotype was observed in comparing of plants-regenerants obtained from genetically distant hybrids and presented different seed production frequencies. Percentages of hexaploid cells as factor explained the greatest data variance 34 %, showing also the lowest AIC value. The influence of colchicine treatment to increase of percentage of hexaploid cells was not significant ($p = 0.864$). Colchicine treatment did not enhance seed production of plants-regenerants.

Ten primers (Kalendar et al., 2010) were used for testing varieties 'Olivin' and 'Fantasia'. Among them three primers (2083, 2273, 2385) revealed differences between varieties in some loci. Primer 2083 showed difference in one locus. The presence of PCR-fragment (dominant allele) in 'Olivin' was observed, while 'Fantasia' is a carrier of recessive allele (lacking PCR fragment) in this locus (designated as locus 1). Primer 2273 revealed differences in two loci: locus 2 with dominant allele in 'Olivin' and recessive in 'Fantasia', and locus 3 with dominant allele in 'Fantasia' and recessive in 'Olivin'. Primer 2385 also produced two loci: locus 4 with dominant allele in 'Olivin' and recessive in 'Fantasia' and locus 5 with dominant allele in 'Fantasia' and recessive in 'Olivin'. All tested plants of both varieties were genetically homogenous.

Selected primers were applied for all obtained plants-regenerants from the hybrid 'Olivin'/'Fantasia'. Frequency of dominant alleles in plants-regenerants ranged from 66.0 % (primer 2385, locus 5) till 93.9 % (primer 2083, locus 1)

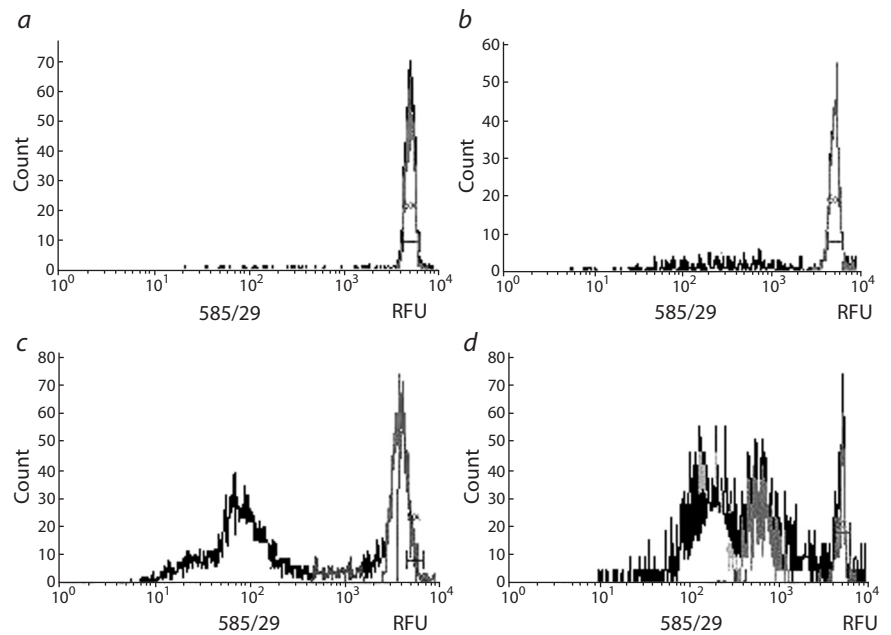


Fig. 1. Examples of flow cytometry results: fluorescence of cell nucleus depending on ploidy level.

a. Fluorescence of nucleus of 6x cells of variety 'Robijs' used as control. b. Fluorescence of cell nucleus of plants-regenerants with ploidy $2n = 6x$. c. Fluorescence of cell nucleus of mixoploid plants-regenerants with leading cell ploidy 2x and 6x. d. Fluorescence of nucleus of mixoploid plants-regenerants with wide spectrum of cells with different ploidy: from 2x till 6x.

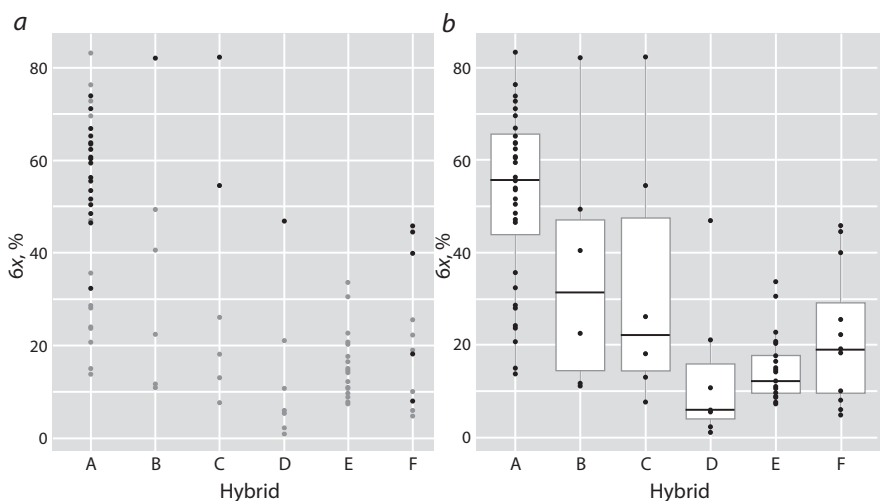


Fig. 2. Distribution of plants-regenerants obtained from genetically different F_1 hybrids (A–F) depending of percentage of 6x cells.

a. Distribution of fertile (black circles) and sterile (grey circles) regenerants. b. Total distribution of regenerants.

(Table 3). In one plant-regenerant (B1-2) *de novo* locus was identified by primer 2083 (Fig. 4), which was present neither in parents nor in other plants-regenerants.

Discussion

The anther culture is one of common methods for wheat DH obtaining. The method drawback is high genotype dependence in all crucial phases of microspore initiation and cultivation and growing of plants-regenerants. The improvement of mother plant cultivation, spikes pre-treatment and anther *in vitro* cultivation enhance the

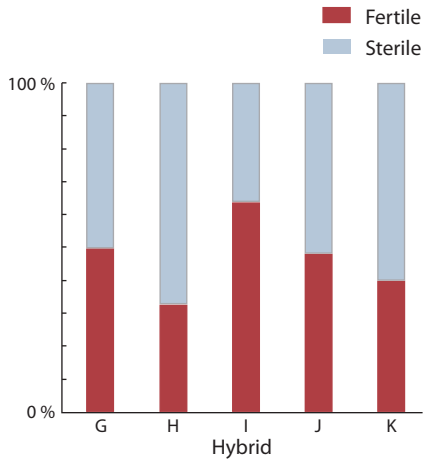


Fig. 3. Proportion of fertile and sterile plants-regenerants of different winter wheat F₁ hybrids (G–K).

frequency of microspore development till green plants-regenerants, but not always led to obtaining of large number of DH (Kunz et al., 2000; Tuveesson et al., 2003). Doubled haploid obtaining in *in vitro* system is related to high cell stress (Touraev et al., 1997) underlying genetic and epigenetic variation of plants-regenerants (somaclonal variation). In the anther culture each plant-regenerant is developed from one microspore (cell), which is subject to genetic changes induced by stress (Dhooghe et al., 2011). Probably, it also explains the high diversity of plants-regenerants by ploidy, including that of regenerants obtained from the same hybrid (Fig. 2). Flow cytometry gives possibility to examine the ploidy of several thousands (in this investigation 3×10^3) cells of each regenerated plant, therefore the obtained results are undeniable. Nevertheless, it is necessary to take into account that for ploidy analysis the leaves were used. In case of plant mixoploidy the percentage of 6x cells in leaves and in flower can be different. It is clear that seeds formed only plants-regenerants that have cells with 6x ploidy, majority of fertile plants-regenerants had more than 40 % of hexaploid cells. The percentage of 6x cells in plants-regenerants and diversity in cell ploidy demonstrated association with mother plant (hybrid) genotype. Percent of spontaneous diploidization of wheat plants-regenerants in anther culture also showed genotype (hybrid) dependence.

Table 2. Results of analysis by generalized linear model (GLM) of influence of different factors on producing of plants-regenerants

Related parameters	Variance, %	P-value	AIC
6x cells, % – presence of seeds	34.45	4.84e-07*	79.17
Genotype – presence of seeds	10.34	0.00133*	106.81
Colchicine treatment – 6x cells, %	–	0.864	127.13

* Significant relations.

Table 3. Frequency of dominant alleles in plants-regenerants of the hybrid Fantazia/Olivin

Primer	Locus designation	Number of tested individuals	Individuals with dominant allele, n (%)
2083	1	66	62 (93.9)
2273	2	75	56 (74.7)
2273	3	52	43 (82.7)
2385	4	48	44 (91.7)
2385	5	47	31 (66.0)

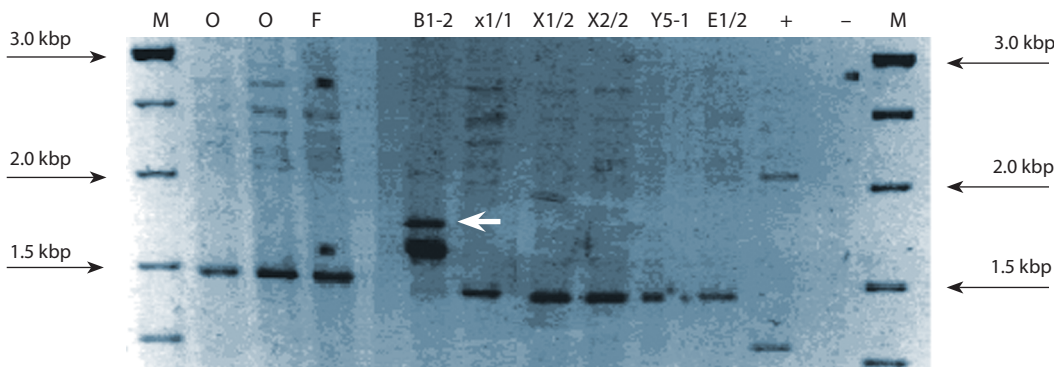


Fig. 4. PCR-products produced with the primer 2083.

M – weight marker; O – ‘Olivin’; F – ‘Fantazia’; B1-2 till E1/2 – plants-regenerants; ‘+’/‘-’ – positive and negative controls. The new band, not presented in any of parents, is pointed by arrow.

The role of colchicine treatment in wheat DH lines production is still a question. For enhancing of DH producing and cell diploidization colchicine can be used as an additional stress factor in the medium of pre-treatment, in the induction medium and directly for the treatment of plants-regenerants (Pauk et al., 2003; Soriano, 2007). In our previous experiments about 10 % of wheat plants-regenerants spontaneous diploidization and producing seeds without colchicine treatment was evaluated. The use of colchicine treatment increased this rate, depending on the genotype, till 20–70 % (Grauda et al., 2014). However, in this study colchicine treatment had not significant positive influence on the increasing of diploid ($2n = 6x$) cell proportion and on fertility of plants-regenerants. It could be suggested that the method is not effective for genotypes without tendency to formation of diploid ($2n = 6x$) cells (self-diploidization).

Using *in vitro* methods, such as anther cultures, is related to development of novel structures, including calluses, what can have influence on the activity of retrotransposons. LTR retrotransposons are located mostly in uncoding regions of plant genome and cannot have direct effect on forming regeneration zones in gametic calluses and on development of plants-regenerants (Kalendar, Schulman, 2006). This assumption is confirmed by results of analysis of plants-regenerants using primer 2083: one of plants-regenerants (B1-2) contains new dominant allele in comparison with both parents what indicate a retrotransposon moving. However, this novelty has not interfered with the development of vital plant. In other cases, somaclonal variation induced by retrotransposons moving can affect different traits of plants. Those changes are unpredictable, they may be hereditary or epigenetic, and most of them are negative from agronomic point of view. For this reason DH lines formed by plants-regenerants often are unusable for obtaining new varieties (Pierik, 1997; Grauda et al., 2005). Certainly, the genetic diversity of the plants-regenerants obtained in anther culture is a combination of parent's allele segregation and somaclonal variation.

Use of all genotypes with different anther response for obtaining of large number of DH lines for breeding makes this method too expensive to be used for routine purposes. Another option is the use of anther culture only for responsive genotypes (Irikova et al., 2011; Murovec, Bohanec, 2012). In this case obtaining high number of DH lines from hybrids of unknown androgenesis response should be organized in two stages: the first – selection from breeding initial material hybrids responsive in anther culture, which produced embryos able to regenerate green plants, and, the second – producing of large number of DH lines from corresponding hybrids. Developing appropriate timeline for obtaining DH plants is option considerably decreasing expenses of DH lines production, especially for winter wheat, and, as well, give a possibility for evolution of some agronomic traits (for example disease resistance) already in the first cycle of creating DH lines.

Acknowledgments

The investigation was supported by the Project of the University of Latvia Nr. ZD2016/AZ103 “Biological diversity – influence, functions and protection. Functional diversity of ecosystems and its contribution to the ecosystems' services” and Scientific agreement Nr. 3-22/2015 “Creating wheat and barley doubled haploid lines” between the Latvia State

Stende Cereals Breeding Institute and Institute of Biology of University of Latvia”.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: caudex and detection methods. *Plant Growth Regulation*. 2011; 63(2):147-173.
- Barnabás B. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.): Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ed.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003;65-70.
- Barnabás B., Pfähler P.L., Kovacs G. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat *Triticum aestivum* L. *Theor. Appl. Genet.* 1991;81:675-678.
- Belchev I., Tchorbadijeva M., Pantchev I. Effect of 5-azacytidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bulgarian J. Plant Physiology*. 2004; 30(1-2):45-50.
- Bennetzen J. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biology*. 2000;42(1):251-269.
- Casacuberta J.M., Santiago N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene*. 2003;311:1-11.
- Chen Z.Z., Snyder S., Fan Z.G., Loh W.H. Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus*. *Plant Breed.* 1994;113:217-221.
- Dhooghe E., van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Culture*. 2011;104:359-373.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. Flow cytometry with plants: an overview: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (Eds.) *Flow cytometry with plant cells*. WILEY-VCH Verlag GmbHCo. KGaA, 2007;41-65.
- Duclercq J., Sangwan-Norreel B., Catterou M., Sangwan R.S. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Science*. 2011;16(11):597-606.
- El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Ann. Agricultural Science*. 2011;56(2):63-72.
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tiss. Organ Culture*. 2010;104(3):301-309.
- Galbraith D.W. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future. *Biomédica*. 2010;30:65-70.
- Goncharov N. Comparative genetics of wheats and their related species. *Novosibirsk*, 2002;177-242.
- Grauda D., Keiša A., Rashal I. Obtaining of doubled haploid lines for Latvian barley and wheat breeding programs by anther culture method. *Sordiaretus Seemnekasvatus*. 2005;9:209-216.
- Grauda D., Lepse N., Strazdiņa V., Kokina I., Lapiņa L., Miķelsone A., Ļubinskis L., Rashal I. Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the Latvian wheat breeding. *Agronomy Research*. 2010;8(3):545-552.
- Grauda D., Miķelsone A., Lisina N., Zagata K., Ornicans R., Fokina O., Lapiņa L., Rashal I. Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals. *Proc. Latvian Academy Sciences, Section B: Natural, Exact, Applied Sciences*. 2014;68(3-4):142-147.
- Grauda D., Strazdiņa V., Kokina I., Lapiņa L., Miķelsone A., Rashal I. Extension of spring wheat breeding using haploids technology. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*. 2009;9(2):263-268.
- Hansen N.J.P., Andersen S.B. *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 1998;102:101-108.
- Irikova T., Grozeva S., Popov P., Rodeva V., Todorovska E. *In vitro* response of pepper anther culture (*Capsicum annum* L.) depending

- on genotype, nutrient medium and duration of cultivation. *Biotechnology Biotechnological Equipment*. 2011;25(4):2604-2609.
- Jacquard C., Nolin F., Hécart C., Grauda D., Rashal I., Dhondt-Cordelier S., Sangwan R.S., Devaux P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clément C. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Reports*. 2009;28:1329-1339.
- Jacquard C., Wojnarowicz G., Clément C. Anther culture in barley. In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ed.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003;21-27.
- Jain S.M., Ahloowalia B.S., Veilleux R.E. Somaclonal variation in crop improvement. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. 1998;203-218.
- Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. iPBS: a universal method for DNA printing and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121:1419-1430.
- Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*. 2006;1(5):2478-2484.
- Kalendar R., Schulman A.H. Transposon-Based Tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*. *Methods Mol. Biology*. 2014;11-15.
- Kasha K.J., Maluszynski M. Production of doubled haploids in crop plants: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ed.). *Doubled Haploid Production in Crop Plant*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003;1-4.
- Khan I.A., Dahot M.U., Seema N., Bibi S., Khatri A. Genetic variability in plantlets derived from callus culture in sugarcane. *Pakistan J. Botany*. 2008;40(2):547-564.
- Kļaviņa D., Grauda D., Priede A., Rashal I. Habitat diversity and genetic variability of *Cypripedium calceolus* in Latvia. Mirek Z., Nikel A., Paul W. (eds). *Actions for Wild Plants*. Committee on Nature Conservation, Polish Academy of Sciences, Kraków, 2014;91-97.
- Kubis S., Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes. 1998;82:45-55.
- Kunz C., Islam S.M.S., Berberat J., Peter S.O., Büter B., Stamp P., Schmid J.E. Assessment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *J. Plant Physiology*. 2000;156:190-196.
- Levan A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*. 1938;24:471-486.
- Li W., Zhang P., Fellers J.P., Friebe B., Gill B.S. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *Plant J*. 2004;40(4):500-511.
- Murovec J., Bohanec B. Haploids and Doubled Haploids in plant Breeding: Abdurakhmonov I.Y. (ed.). *Plant Breeding*. Rijeka, 2012; 87-101.
- Pauk J., Mihaly R., Puolimatka M. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ed.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003;249-254.
- Pierik R.L.M. *In vitro* Culture of Higher Plants. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1997;344.
- Quinn G.P., Keough M.J. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, 2002;537.
- Ramsey J., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Ann. Review Ecology Systematics*. 1998;29:467-501.
- Rubtsova M., Gnad H., Melzer M., Weyen J., Gils M. The auxins centrophenoxine and 2.4-D differ in their effects on non-directly induced chromosome doubling in anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Biotechnology Reports*. 2012;1-9.
- Smith R.P., Park S.H. Tissue culture for crop improvement: Quantitative genetics. *Genomics Plant Breeding*. 2002;189-196.
- Smýkal P., Bačova-Karteszova N., Kalendar R., Corander J., Schulman A.H., Pavelek M. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:1385-1397.
- Soriano M., Cistué L., Vallés P.M., Castillo A. M. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2007;91:225-234.
- Tadesse W., Inagaki M., Tawkaz S., Baum M., van Ginkel M. Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding. *African J. Biotechnology*. 2012;11(89):15484-15492.
- Torp A.M., Hansen A.L. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica*. 2001;119:377-387.
- Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Science*. 1997;2(8):297-302.
- Turesson S., von Post R., Ljungberg A. Wheat anther culture: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ed.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003;71-76.
- Xynias I.N., Zamani I.A., Gouli-Vavdinoudi E., Roupakias D.G. Effect of cold pretreatment and incubation temperature on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Cereal Research Communications*. 2001;29(3-4):331-338.
- Yılmaz M., Ozic C., Gok I. Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis, Gel Electrophoresis – Principles and Basics. 2012.
- Zamani I., Gouli-Vavdinoudi E., Kovacs G., Xynias I., Roupakias D., Barnabás B. Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F1 hybrids. *Plant Breeding*. 2003;122(4):314-317.

Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне

О.П. Митрофанова , А.Г. Хакимова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

В обзоре приведены сведения о генетических исследованиях содержания белка в зерне у разных видов *Triticum* L. и *Aegilops* L. Рассмотрены закономерности географической изменчивости этого важного селекционного признака и результаты многолетней оценки по нему образцов коллекции ВИР. На основе этих оценок сформирована стержневая коллекция высокобелковых генетических источников. В нее включены диплоидные виды эгилопс – доноры геномов *B*, *G* и *D* аллополиплоидных пшениц и образцы ди-, тетра- и гексаплоидных видов пшеницы. В 1970–1980-е гг. использование высокобелковых источников в селекции США и Канады привело к увеличению содержания белка в зерне мягкой пшеницы на 0,5–3,0 %, однако дальнейшего целенаправленного его повышения с помощью традиционных методов селекции достичь не удалось. Прорыв в увеличении содержания суммарного белка в зерне наметился с развитием методов молекулярной генетики и разработки молекулярных маркеров. Впервые у *T. dicoccoides* был идентифицирован функциональный локус, или ген *Gpc-B1* (хромосома 6BS), влияющий на накопление белка, цинка и железа в зерне, который клонирован и детально изучен. С использованием молекулярных маркеров активный аллель этого гена был обнаружен у некоторых местных и старых селекционных сортов *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta* и *T. aestivum*. Более того, у мягкой пшеницы были выявлены гены *Gpc-A1*, *Gpc-D1* и *Gpc-2* на хромосомах 6A, 6D и второй гомеологичной группы соответственно. Все эти гены были идентифицированы как NAC-факторы транскрипции, играющие важную роль в ускоренном старении растений и ремобилизации питательных веществ из листьев в зерно. Гены, родственные *Gpc-B1* *T. dicoccoides*, обнаружены в *G* геноме *T. timopheevii* и в *B* (= *S*) геноме у различных видов *Aegilops* sect. *sitopsis*. Функциональные аллели *Gpc-B1* введены в коммерческие сорта тетра- и гексаплоидной пшеницы, и как результат, в разных странах мира созданы новые высокобелковые и высокоурожайные сорта и серии почти изогенных линий, перспективные для научных исследований и селекции пшеницы.

Ключевые слова: генетические ресурсы; *Triticum*; *Aegilops*; содержание белка в зерне; гены *GPC*; NAC-факторы транскрипции; старение; ремобилизация; молекулярные маркеры; селекция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):545-554. DOI 10.18699/VJ16.177

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mitrofanova O.P., Khakimova A.G. New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):545-554. DOI 10.18699/VJ16.177

УДК 581.154:547.96:633.111:633.112:633.113
Поступила в редакцию 22.04.2016 г.
Принята к публикации 15.06.2016 г.
© АВТОРЫ, 2016

New genetic resources in wheat breeding for an increased grain protein content

O.P. Mitrofanova , A.G. Khakimova

N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

The present review offers an overview of genetic research on grain protein content (GPC) in various *Triticum* L. and *Aegilops* L. species. Regularities in geographic variability of GPC and the results of a long-term screening of accessions from the VIR collection for this trait are considered. On the basis of these assessments, a core-collection of genetic sources with high GPC has been formed. It includes the diploid *Aegilops* species as donors of *B*, *G* and *D* genomes for allopolyploid wheats, as well as accessions of di-, tetra- and hexaploid wheat species. The use of high-protein sources in wheat breeding in the United States and Canada in the 1970's–1980's resulted in the bread wheat GPC increase by 0.5–3.0 %; however, further purposeful attempts at increasing GPC by traditional breeding methods failed. A breakthrough in increasing the total GPC has been achieved as a result of molecular genetics methods and molecular markers development. For the first time, a functional locus, or the *Gpc-B1* gene (chromosome 6BS) affecting the accumulation of protein, Zn and Fe in grain, was identified in *T. dicoccoides*, cloned and studied in detail. The application of molecular markers has revealed the active allele of this gene in some landraces and old cultivars of *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. spelta* and *T. aestivum*. Moreover, *Gpc-A1*, *Gpc-D1*, and *Gpc-2* wheat genes have been found in chromosomes 6A, 6D and homeologous group 2, respectively. All these genes have been identified as NAC transcription factors, which play an important role in the accelerated senescence of plants and remobilization of nutrients from leaves to grain. The genes related to *Gpc-B1* from *T. dicoccoides* were found in the *G* genome of *T. timopheevii* and *B* (= *S*) genome of different species of *Aegilops* sect. *sitopsis*. Functional *Gpc-B1* alleles have been introduced into commercial tetra- and hexaploid wheat cultivars, and it resulted in the creation of new high-protein and high-yield cultivars and series of nearly isogenic lines in different countries. They are promising sources for research and wheat breeding purposes.

Key words: genetic resources; *Triticum*; *Aegilops*; grain protein content; *GPC*-genes; NAC transcription factor; senescence; remobilization; molecular markers; breeding.

Содержание суммарного белка (Grain protein content, GPC) и состав индивидуальных белков – важные составляющие качества зерна пшеницы. От них зависят пищевая ценность и технологические достоинства зерна, а также качество вырабатываемых из него круп и муки. Для хлебопечения, изготовления макарон, лапши, кондитерских изделий или для кормопроизводства требуется зерно с различными технологическими и товарными характеристиками, в том числе с разным уровнем содержания белка.

В бывшем СССР были достигнуты выдающиеся успехи по созданию высокоурожайных сортов сильной и ценной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и улучшению качества зерна твердой пшеницы *T. durum* Desf. Один из факторов, способствующих этим успехам, – вовлечение в селекцию охарактеризованного по различным признакам мирового разнообразия пшениц сорта из коллекции Всесоюзного института растениеводства (ныне ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», ВИР). Создание высокоурожайных и высококачественных сортов остается приоритетной задачей и для современной селекции пшеницы.

Основная цель данного обзора – рассмотреть в историческом аспекте формирование генетических ресурсов пшеницы для использования в селекции на увеличение содержания суммарного белка в зерне; охарактеризовать недавно выявленные *Gpc*-гены, которые открывают новые возможности для работы с этим признаком, и показать достигнутые успехи по введению функциональных аллелей *Gpc-B1* в различные сорта.

Формирование в составе коллекции ВИР генофонда высокобелковых источников

В различных странах мира к началу XX в. многочисленными исследованиями был определен комплекс основных внешних и внутренних факторов, влияющих на накопление белка в зерне (Иванов, 1928–1929, 1947). Среди внешних факторов названы климат (температура, количество осадков) и плодородие почвы (содержание доступного азота для растения), при этом роль климата признана значительной, но не решающей, поскольку улучшением плодородия почвы можно было существенно нивелировать влияние естественных различий по климатическим условиям. Среди внутренних факторов приоритет отдан генотипу сорта, который контролирует процессы роста и развития растений пшеницы, поглощения и усвоения из окружающей среды химических элементов. Одну из лидирующих позиций в этих исследованиях занимал ВИР. Исследования были тесно связаны с проведением географических посевов и организованной в 1924 г. Н.И. Вавиловым сетью Государственного испытания новых и интродуцированных сортов мягкой и твердой пшеницы (Иванов, 1928–1929; Иванов, Княгиничев, 1936; Княгиничев, 1951). На основе многолетнего изучения сортов в различных почвенно-климатических условиях были составлены ориентировочные географические карты среднего содержания белка в зерне для каждого региона возделывания. Наиболее пригодными для получения высокобелкового (17–19 % и более) зерна мягкой

и твердой пшеницы оказались юго-восток европейской части РСФСР, степь Средней и Нижней Волги, Предкавказье, степь и южная лесостепь Западной Сибири, степная часть Украинской ССР, северная и южная части Казахской ССР (Иванов, 1947). Впервые было установлено, что при продвижении пшеницы с северо-запада на юго-восток увеличивается содержание белка, что, возможно, связано с увеличением дефицита осадков и доли почв, богатых азотом.

Обобщение и сравнительный анализ литературных сведений о среднем содержании белка в зерне пшеницы отдельных стран мира за период с 1920 по 1930 г. дали основание К.А. Фляксбергеру (1932) добавить к перечисленным выше регионам бывшего СССР степные и лесостепные районы Северной Америки, где также у пшеницы формируется высокобелковое зерно. Наиболее низкий процент белка в зерне был определен для сортов из стран с орошаемым земледелием (Вавилов, 1935).

Следующий пик активности исследований качества зерна пришелся на период с 1960 по 1980 гг. Основной акцент был сделан на поиск в коллекции пшеницы ВИР источников высокого содержания белка с наиболее сбалансированным составом по незаменимым аминокислотам, прежде всего лизину и триптофану (Конарев, 1975; 1980; Конарев, Чмелева, 1977). Вместе с мягкой и твердой пшеницей оценивали другие виды *Triticum* L. и различные виды *Aegilops* L. Выявлено довольно большое число генетических источников, стабильно воспроизводивших свои характеристики при выращивании в различных почвенно-климатических условиях (Покровская, 1967; Якубцинер, Покровская, 1969; 1971а, б; Покровская, Хорева, 1971; Тютюрев и др., 1973; Конарев и др., 1979). По мере выявления все эти источники условно объединяли в отдельный генофонд, стержневую коллекцию, высокобелковых пшениц. В ней представлены дикие, слабокультурные и возделываемые виды пшеницы и дикие виды эгилопс, предполагаемые доноры геномов *B*, *G* и *D* аллополиплоидных пшениц. Перечень видов, имеющих образцы с более высоким содержанием белка в зерне, чем у мягкой и твердой пшеницы, приведен в таблице, в которой также показаны пределы варьирования признака и его средняя величина. Паспортные данные высокобелковых образцов-источников можно найти в публикациях и каталогах ВИР. Обширная информация о мягкой пшенице с высоким содержанием белка в зерне также приводится в статье V.A. Johnson (1976).

В 1970–1980-х гг. в различных странах мира были разработаны селекционные программы по созданию высокобелковой пшеницы и проведены селекционно-генетические исследования внутривидовых гибридов, полученных с участием высокобелковых источников мягкой и твердой пшеницы. Наиболее интенсивное развитие эти исследования получили в США и Канаде, где количество белка в зерне сортов мягкой пшеницы было увеличено на 0,5–3,0 %. (Shewry, 2007). Было показано, что признак «содержание суммарного белка в зерне» – полигенный. На его проявление сильное влияние оказывают условия внешней среды, однако в гибридных расщепляющихся популяциях выявляются формы, уклоняющиеся в сторону высокобелкового родителя. Повысить у потомков этих

Характеристика видов *Aegilops* L. – доноров геномов *B*, *G* и *D* аллополиплоидной пшеницы и видов *Triticum* L. по содержанию суммарного белка в зерне*

Группы видов (число хромосом, геном)	Число изученных образцов	Белок в зерне, %	
		Лимиты	Средняя величина
Дикие виды			
<i>Ae. speltooides</i> ($2n = 2x = 14, BB$)	5	19,0–26,9	22,9
<i>Ae. tauschii</i> ($2n = 2x = 14, DD$)	22	17,3–23,0	19,9
<i>T. urartu</i> ($2n = 2x = 14, A^uA^u$)	1	23,1	
<i>T. boeoticum</i> ($2n = 2x = 14, A^bA^b$)	11	23,0–30,6	26,9
<i>T. dicoccoides</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	10	18,3–30,6	25,2
<i>T. araraticum</i> ($2n = 4x = 28, GGA^bA^b$)	10	20,9–31,6	25,2
Слабоокультуренные виды пшеницы			
<i>T. sinskajae</i> ($2n = 2x = 14, A^bA^b$)	1	21,5	
<i>T. monococcum</i> ($2n = 2x = 14, A^bA^b$)	81	15,3–24,6	18,9
<i>T. dicoccum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	407	12,7–25,7	18,3
<i>T. ispahanicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	1	21,1	
<i>T. aethiopicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	8	17,1–25,6	20,2
<i>T. persicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	152	11,4–23,0	17
<i>T. polonicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	9	15,9–26,9	19
<i>T. turanicum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	26	14,5–22,7	17,3
<i>T. turgidum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	7	15,1–20,0	16,7
<i>T. spelta</i> ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	16	13,8–23,4	19,5
<i>T. vavilovii</i> ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	2	17,2–20,9	19,1
<i>T. petropavlovskiyi</i> ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	2	18,5–19,5	19
<i>T. timopheevii</i> ($2n = 4x = 28, GGA^bA^b$)	5	18,7–22,0	19,7
<i>T. timonovum</i> ($2n = 8x = 56, GGGGA^bA^bA^bA^b$)	1	24,9	
<i>T. zhukovskiyi</i> ($2n = 6x = 42, GGA^bA^bA^bA^b$)	1	23,6	
<i>T. fungicidum</i> ($2n = 8x = 56, GGBBA^uA^uA^bA^b$)	1	17,7	
Культурные виды пшеницы			
<i>T. durum</i> ($2n = 4x = 28, BBA^uA^u$)	398	12,1–21,4	16,2
<i>T. aestivum</i> , озимая ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	332	9,9–18,2	14,5
<i>T. aestivum</i> , яровая ($2n = 6x = 42, BBA^uA^uDD$)	140	12,3–18,3	15,7

*Обобщены данные из Каталогов мировой коллекции ВИР: 1972, Вып. 100; 1976, Вып. 182; 1977а, б, Вып. 203 и 215; 1983, Вып. 364; 1999, Вып. 698; 2003, Вып. 744.

форм содержание белка можно с помощью возвратных скрещиваний с ним (Дорофеев и др., 1972, 1987; Johnson et al., 1985). Между содержанием белка в зерне и урожайностью обнаружена отрицательная корреляция, которая усложняет селекцию на повышение обоих признаков одновременно. По этой причине, а также вследствие сложной полигенной природы признака и сильной его изменчивости под действием внешних факторов достичь дальнейшего существенного повышения содержания белка в зерне пшеницы не удалось. В настоящее время почти во всех хромосомах пшеницы обнаружено большое число главных и минорных локусов, влияющих на количество белка в зерне (Balyan et al., 2013; McIntosh et al., 2013). Локусы вовлечены в эпистатические взаимодействия

и не стабильны в своем фенотипическом проявлении. Многие из них рассмотрены в обзоре В.А. Крупнова и О.В. Крупновой (2012). Важно отметить, что до конца XX в. высокобелковые источники слабоокультуренных и диких видов пшеницы мало использовались в селекции на увеличение содержания белка, потенциал их генетического разнообразия не раскрыт.

Гены *Gpc-1* (*NAM-1*) и *Gpc-2* (*NAM-2*) *T. dicoccoides* (Koern. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., влияющие на содержание белка в зерне

Новые возможности для селекции на повышение суммарного белка в зерне появились в связи с выявлением у *T. dicoccoides* ($2n = 4x = 28$, геномная формула BBA^uA^u),

или дикой двузернянки, крупнозерных высокобелковых образцов (Avivi, 1978). Один из таких образцов, FA-15-3 (далее DIC), из Израиля, был включен в скрещивания с твердой пшеницей, сортом Langdon (далее LDN), для определения хромосом, влияющих на количество белка в зерне (Jorra, Cantrell, 1990; Cantrell, Jorra, 1991). Изучение дисомных линий сорта LDN с чужеродным замещением хромосом показало, что наиболее высокий процент белка был у линии LDN(DIC-6B), несущей пару хромосом 6B от DIC. С помощью рекомбинантных замещенных линий, полученных от скрещивания этой линии с реципиентным сортом LDN, был выявлен локус, влияющий на содержание белка. Он был обозначен как локус количественного признака *QGpc.ndsu-6Bb* и картирован в коротком плече 6B хромосомы, вблизи центромеры, между маркерными локусами *Xabg387-6B* и *Xmwg79-6B* (Jorra et al., 1997). Позднее этот локус успешно был передан в яровую мягкую пшеницу (Mesfin et al., 1999).

Для выяснения функции *QGpc.ndsu-6Bb* и уточнения границ его местоположения в пределах переданного хромосомного сегмента от DIC были использованы различные молекулярные маркеры и построены генетическая и физическая карты высокой плотности переданного сегмента. Кроме того, была определена микроколлинеарность между генами в этом сегменте и на участке короткого плеча хромосомы 2 *Oryza sativa* L., выявляемому теми же маркерами (Olmos et al., 2003; Distelfeld et al., 2004, 2006). Локус высокого содержания белка был определен как простой менделевский ген *Gpc-B1* примерно в центральной части сегмента, на участке размером в 2,7 сМ между маркерными локусами *Xcdo365* и *Xicw67*. Установлен высокий уровень коллинеарности между генами большей части (2,1 сМ) этого участка, фланкированного маркерными локусами *Xicw75* и *Xicw67*, и фрагмента в 350 т. п. н. короткого плеча хромосомы 2 риса. Показано, что один из маркерных локусов, а именно *Xuhw84*, ко-сегрегирует с геном *Gpc-B1*. Он ортологичен гену риса *OSJNBa002E05.19-1* и может быть геном-кандидатом для *Gpc-B1*.

При дальнейшем уточнении границ участка, в котором локализован *Gpc-B1*, была найдена последовательность размером 7,4 т. п. н., идентифицированная между маркерными локусами *Xuhw106* и *Xicw109* как ген, кодирующий NAC-доменный белок (Uauy et al., 2006b). NAC-белки, принадлежащие к одному из самых больших и специфичных для растений семейств NAC-факторов транскрипции, участвуют в регуляции различных программ развития растений, контроле защитных реакций на биотические и абиотические стрессоры, они играют важную роль в процессе старения растений (Olsen et al., 2005; Puranik et al., 2012; Rahaie et al., 2013; Podzimskas-Sroka et al., 2015). Первые члены этого семейства были выявлены и охарактеризованы у петунии (*Petunia*): NAM (Non-Apical Meristem) транскрипционный фактор, ответственный за образование апикальной меристемы побега, а также в растениях модельного объекта *Arabidopsis thaliana*: ATAF1 (Arabidopsis Transcription Activation Factor), ATAF2 и CUC2 (Cup-Shaped Cotyledon). Первые два белка у арабидопсиса участвуют в регуляции ответных реакций на механическое повреждение растений и небла-

гоприятные абиотические факторы, которые сопряжены с биосинтезом абсцизовой кислоты, последний из них определяет границу между семядолями при развитии зародышка. На основании выявленного сходства гена *Gpc-B1* с NAC-фактором транскрипции он был также обозначен как *NAC-B1 = NAM-B1 (DQ869673)*.

Определена нуклеотидная последовательность и установлена экзон-интронная структура функционального аллеля, или аллеля дикого типа гена *Gpc-B1*. Он содержит 1542 п. н. и включает три экзона и два интрона. Белок, рассчитанный для этой нуклеотидной последовательности, состоит из 405 аминокислотных остатков, имеет консервативный N-концевой участок, или NAC-домен с пятью субдоменами (A, B, C, D, E) в позициях аминокислот 34-55; 66-80; 88-124; 139-166 и 193-205 соответственно и сильно изменчивый C-концевой участок активации транскрипции TAR (Transcriptional Activation Region) (Uauy et al., 2006b; Dubcovsky et al., 2010). В его составе часто встречаются простые повторы аминокислот и повторяющиеся последовательности, богатые серином, треонином, пролином, глутамином или кислыми аминокислотами (Olsen et al., 2005). При сравнении нуклеотидных последовательностей гена *Gpc-B1* у LDN и DIC было обнаружено, что в позиции 933 у LDN имеется вставка 1 п. н., приводящая к сдвигу рамки считывания. Рассчитанный для этого аллеля белок содержал 327 аминокислотных остатков и был неактивным (Uauy et al., 2006b).

Чтобы понять, каким образом функциональный аллель *Gpc-B1* увеличивает содержание белка, М.А. Kade с коллегами (2005) сравнили почти изогенные рекомбинантные замещенные линии, несущие активные или неактивные аллели *Gpc-B1*, с реципиентным сортом LDN по содержанию растворимого белка и аминокислот во флаговых листьях и концентрации суммарного азота в колосьях, зерне и стеблях. На основании полученных данных было сделано заключение, что линия, содержащая функциональные аллели *Gpc-B1*, накапливает больше белка в результате эффективной ремобилизации азота из листьев в колосья во время налива зерна. Значительные различия между некоторыми рекомбинантными замещенными линиями твердой пшеницы наблюдали также по скорости их старения, проявляющегося в пожелтении стебля и флаговых листьев, и снижении во флаговых листьях содержания хлорофилла (Uauy et al., 2006a). Эти различия были полностью сопряжены с наличием *Gpc-B1* от DIC, а точнее – участка размером 250 т. п. н. (0,3 сМ), фланкированного маркерными локусами *Xuhw89* и *Xicw71*.

Известно, что старение – это запрограммированная деградация компонентов клетки, делающая доступными питательные вещества для ремобилизации в развивающиеся семена. Возможно, *Gpc-B1* участвует в контроле этого процесса и обладает широким плейотропным эффектом (Distelfeld et al., 2007). В зерне рекомбинантных инбредных линий, несущих аллели от DIC, в сравнении с линиями, содержащими аллели от LDN, была обнаружена более высокая концентрация не только белка (в среднем на 38 %), но и цинка (12 %), железа (18 %) и марганца (29 %).

В дополнение к гену *Gpc-B1* мягкая пшеница имеет также активные гомеологичные гены *Gpc-A1* и *Gpc-D1*

на хромосомах 6A и 6D, которые участвуют в регуляции тех же процессов, что и *Gpc-B1* (Uauy et al., 2006b; Avni et al., 2014). У *Gpc-A1* идентифицировано пять аллелей, причем активный аллель *Gpc-A1a* выявлен преимущественно у яровой мягкой пшеницы из Непала, Китая и Японии, а неактивные *Gpc-A1b* и *Gpc-A1d* – у одного местного сорта из Грузии и в современных сортах Европы соответственно (Cormier et al., 2015). Более того, на хромосомах второй гомеологичной группы обнаружены паралогичные гены *Gpc-2* (*NAM-2*) (Uauy et al., 2006b). Они имеются и у твердой пшеницы (Distelfeld et al., 2012). На уровне ДНК сходство между генами *Gpc-1* и *Gpc-2* составляет 91 %, что указывает на относительно недавнюю дупликацию *Gpc-2* (Dubcovsky et al., 2010; Pearce et al., 2014).

Для изучения суммарного эффекта генов *Gpc* использовали метод интерференции РНК, или подавления (*silencing*) экспрессии генов. Для этого на основе сорта мягкой пшеницы Bobwhite, содержащего функциональные аллели генов *Gpc-A1* (хромосома 6A), *Gpc-D1* (6D), *Gpc-B2* (2B), *Gpc-D2* (2D) и делецию гена *Gpc-B1* (6B), были получены трансгенные линии (Uauy et al., 2006b). С помощью ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) и геном-специфичных праймеров у одной из трансгенных линий на четвертый–девятый день после цветения наблюдали снижение в сравнении с контролем уровня транскрипции всех генов на 40–60 %, у другой трансгенной линии эффект был слабее. Одновременное подавление экспрессии всех *Gpc*-генов приводило к задержке старения растений более чем на три недели и сопровождалось снижением количества азота, цинка и железа в зерне. Изученные трансгенные линии подтверждали свои характеристики в течение двух поколений, что указывало на наследственную природу выявленных эффектов (Fu et al., 2007; Waters et al., 2009).

Поскольку гены *Gpc* относятся к NAC-факторам транскрипции, представляло интерес на этих же линиях определить, работу каких генов они регулируют. С использованием современных технологий секвенирования (Roche 454 pyrosequencing и Illumina systems) D. Cantu с коллегами (2011) на 12-й день после цветения провели транскриптомный анализ флаговых листьев у трансгенных линий сорта Bobwhite в сравнении с нетрансгенным контролем и показали, что процесс старения у растений пшеницы сопряжен с изменениями в экспрессии нескольких сотен генов. Среди них были гены-транспортеры, гены, участвующие в фотосинтезе, регулирующие метаболические процессы и ответные реакции на стрессоры, и др. Различия по уровню их экспрессии обнаруживали задолго до появления визуальных симптомов старения.

Для выяснения функции каждого из генов *Gpc* семена мягкой пшеницы сорта Express и твердой пшеницы Kronos были обработаны раствором 1 % этилметансульфоната, и с помощью метода Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) отобраны мутации, приводящие к образованию нефункционального белка (Avni et al., 2014; Pearce et al., 2014). У мягкой пшеницы их носителями стали одиночные мутанты *gpc-A1* и *gpc-D1*, а также двойной мутант *gpc-A1/gpc-D1*, у твердой пшеницы – одиночные мутанты *gpc-A1* и *gpc-B2* и двойной – *gpc-A1/gpc-B2*, у них было блокировано действие соответствующих генов. Мутанты имели почти идентичные профили экспрессии

во флаговых листьях на стадии колошения. Различия в наборах экспрессируемых генов начинали четко проявляться лишь на 12-й день после цветения. Доля генов, регулируемых *Gpc-A1*, была выше (64,2 %) доли генов, регулируемых *Gpc-B2* (37,1 %), причем каждый из этих генов участвовал в регуляции экспрессии разных наборов генов, связанных со старением. Выявлена группа локусов, экспрессия которых регулировалась комбинацией двух генов.

Таким образом, проведенные в мире исследования показали, что действие генов *Gpc*, влияющих на содержание белка в зерне, проявляется после цветения, на раннем этапе старения растения, и связано с ремобилизацией питательных веществ из вегетативных органов растения в зерно в процессе его налива.

Новые генетические источники высокого содержания белка в зерне

Благодаря разработке молекулярных маркеров, выявляющих функционально активные и/или неактивные аллели *Gpc-B1*, стали возможными генетический скрининг образцов коллекций и ускоренный отбор из гибридных популяций генотипов с определенным составом аллелей (Vishwakarma et al., 2014; Mishra et al., 2015). Для этих целей часто используют почти совершенный кодоминантный маркер *Xuhw89*, расположенный на расстоянии 0,1 сМ от *Gpc-B1* (Distelfeld et al., 2006), или маркеры, находящиеся от него на расстоянии 0,3–1,5 сМ, такие как *Xucw79*, *Xucw71*, *Xcdo365* и *Xucw67*, и другие маркеры (Khan et al., 2000; McIntosh et al., 2013; Wheat Applied Genomics. MASWheat Quality traits. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/HGPC/>).

С использованием молекулярных маркеров функциональный аллель *Gpc-B1* был обнаружен у 42 образцов *T. dicoccoides* и у 17 из 19 изученных образцов *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl., или культурной полбы (Uauy et al., 2006a). Напротив, 57 сортов твердой пшеницы и 34 сорта мягкой пшеницы или содержали инсерцию 1 п. н., или имели делецию гена – частичную или полную, и как следствие, – неактивный продукт или его отсутствие.

Невыявление функциональных аллелей *Gpc-B1* у современных сортов могло быть связано с их потерей или в процессе доместикиации, или в современный период селекции. Для проверки, какое из двух предположений верное, L. Asplund с коллегами (2010) генотипировали 63 исторических сортообразца из музейной коллекции The Royal Swedish Academy of Forestry and Agriculture (Швеция). Большая часть этих образцов была представлена на Международной выставке в Лондоне в 1862 г. Для 32 образцов, происходящих из различных стран мира, удалось получить продукты амплификации. При их секвенировании было показано, что Галицийская (Galizian) яровая мягкая пшеница из Польши, сорт озимой пшеницы Marigold из Германии и два образца *T. spelta* L. из Центральной Европы имели функциональные аллели *Gpc-B1*. Таким образом, в XIX в. в генотипах некоторых гексаплоидных пшениц функциональные аллели *Gpc-B1* присутствовали.

В исследованиях J. Hagenblad с коллегами (2012) для поиска функциональных аллелей *Gpc-B1* использовали три набора образцов: (1) стержневую коллекцию гексапло-

идной пшеницы, созданную в INRA (Франция) и состоящую из 367 образцов, отобранных как репрезентативная выборка из 3942 образцов различного географического происхождения и охарактеризованных по аллельному разнообразию 38 полиморфных микросателлитных локусов (Balfourier et al., 2007); (2) выборку из 138 сортов яровой мягкой пшеницы преимущественно из скандинавских стран и Канады; (3) набор из 22 образцов *T. spelta*. В стержневой коллекции функциональные аллели *Gpc-B1* встречались с частотой 1 %, аллели с инсерциями в 1 п. н. – 28 %, и продукты амплификации не были выявлены в 66 % случаев. Небольшая часть стержневой коллекции была представлена гетерогенными образцами. В двух других изученных наборах функциональные аллели *Gpc-B1* встречались чаще: у *T. spelta* – 22,7 %, среди яровой мягкой пшеницы – 33,3 %. Из них семенной материал 28 сортов, созданных за период с 1890 по 1981 г., имеется в коллекции ВИР. В их число входят сорта Stanley к-22165 из Канады; Diamant к-25019 и Rubin к-38203 из Швеции; Ruskea к-25845, Sori к-33949 и Luja к-57198 из Финляндии; Nora к-43714 и Lanok к-53573 из Норвегии и др. (Asplund et al., 2013).

Таким образом, функциональные аллели гена *Gpc-B1* сохранились и в сортах, созданных в XX веке, но редко встречаются, если судить по результатам оценки исследованной к настоящему моменту выборки сортов. По-видимому, в современный период селекции пшеницы продолжается неконтролируемый процесс их утраты.

С целью поиска функциональных аллелей *Gpc* в *G* геноме *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ($2n = 4x = 28$, GGA^bA^b) были разработаны праймеры на основе известной полной нуклеотидной последовательности гена *DQ871219 T. dicoccoides*. С помощью этих праймеров у 12 образцов *T. timopheevii* из коллекций разных стран получены продукты амплификации, они клонированы и секвенированы (Hu et al., 2013). Показано, что все 12 нуклеотидных последовательностей имели одинаковую длину (1546 п. н.) и обладали типичными характеристиками генов NAC-семейства. Аминокислотная последовательность, рассчитанная для каждого из 12 *Gpc-G1* генов, включала 407 аминокислот, полипептиды имели сходство с белком гена *Gpc-B1 T. dicoccoides*. С использованием ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) было продемонстрировано, что уровни экспрессии 12 генов *Gpc-G1* различны и именно с ними наблюдается высокая положительная корреляция ($r = 0,957$, $p < 0,01$) содержания белка в зерне изученных образцов. Филогенетический анализ 12 генов *Gpc-G1* с 14 известными *NAM*-генами подтвердил их большее сходство с генами шестой гомеологичной группы хромосом, а не второй, которая контролирует высокое содержание белка в зерне ячменя *Hordeum vulgare* L.

По аналогичной схеме были изучены и охарактеризованы 11 аллелей *Gpc* у различных видов *Aegilops* L. sect. *sitopsis*: *Ae. speltoides* Tausch, *Ae. bicornis* (Forssk.) Jaub. & Spach, *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl., *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex Hammer, *Ae. sharonensis* Eig, предполагаемых доноров геномов *B* и *G* различных видов пшеницы (Hu et al., 2012). Полная длина нуклеотидных последовательностей этих аллелей с тремя экзонами и двумя интронами варьировала от 1540 до 1555 п. н. Они имели

высокую степень идентичности (96,28 %) между собой и высокую гомологию с *Gpc-B1* и *Gpc-G1*. Кодированные этими последовательностями белки обладали всеми признаками NAC-белка. По-видимому, эти гены выполняют такую же функцию, как и *Gpc-B1*. Построенное на основе сравнения полных нуклеотидных последовательностей генов филогенетическое дерево позволило продемонстрировать, что *B* и *G* геномы пшеницы имеют наиболее высокий уровень сходства с геномом *Ae. speltoides*.

Интрогрессия функциональных аллелей *Gpc-B1* в мягкую и твердую пшеницы

О возможности передачи генов высокого содержания белка не только от DIC, но и от других образцов дикой двузернянки сообщали (Klindworth et al., 2009; Aykut Tonk et al., 2010; Hussein et al., 2014).

Первыми гексаплоидными формами с яровым типом развития, в которые целенаправленно были введены функциональные аллели *Gpc-B1*, стали созданные в США сорт Glupro (ND-643) и селекционные линии ND-683 и ND-645, полученные от скрещивания с DIC (Mesfin et al., 1999). В дальнейшем с участием сорта Glupro получены новые сорта твердозерной озимой мягкой пшеницы – Farnum (к-65944) (<http://washingtoncrop.com/documents/Wheat/Winter/Hard%20Red/Farnum.pdf>), яровой мягкой пшеницы – Lassik, твердой пшеницы – Westmore и Desert King-High Protein (HP) (http://smallgrains.ucdavis.edu/cereal_files/WhtCVDesc_LJ11.pdf).

В Канаде посредством создания дигиплоидов и применения маркер-контролируемого отбора получено три коммерческих сорта яровой мягкой пшеницы. Из них Lillian (DePauw et al., 2004) и Somerset (Fox et al., 2005) относятся к товарному классу канадских западных яровых краснозерных сортов, а Burnside – к канадским западным сверхсильным сортам (Humphreys et al., 2009). Донором функциональных аллелей *Gpc-B1* для сорта Lillian служила линия 90B07-AU2B от скрещивания Pasqua*2/ND643. В сравнении с ней и линией ND643, ставшей впоследствии сортом Glupro, у Lillian участок хромосомы, интродуцированный от DIC, был меньше по размеру, но в нем также присутствовал ген *Yr36* устойчивости взрослых растений к желтой ржавчине, тесно сцепленный (0,3 cM) с функциональным аллелем *Gpc-B1* (DePauw et al., 2011; Hale et al., 2012; Randhawa et al., 2013). Созданные сорта или уступали, или незначительно превосходили, или не отличались по урожайности от сортов, у которых не являлся маркер гена *Gpc-B1*, но все они имели более высокий процент белка в зерне (от 13,4 до 16,1 %) и созревали на два–три дня раньше. Сорт Lillian также содержал блок сцепленных генов *Lr34/Yr18* (хромосома 7D) устойчивости к бурой и желтой ржавчине, имел выполненный стебель и был устойчивым к пшеничному стеблевому пилильщику *Cephus cinctus* Nort., распространенному в Северной Америке.

С целью уточнения эффектов функциональных аллелей *Gpc-B1* на содержание белка в зерне в разных генетических средах, определения их влияния на другие признаки и факторов внешней среды на их проявление в разных странах мира были созданы и изучены серии почти изогенных линий на основе мягкой и твердой пшеницы.

В США для введения функциональных аллелей *Gpc-B1* использовали сорта и линии мягкой пшеницы Anza, Yesoga Rojo, Attila, UC1037, UC1041, а также твердой пшеницы – Kofa, Kronos, UC1113, причем у Yesoga Rojo и UC1113, как и у Lilian, введенный функциональный аллель *Gpc-B1* был тесно сцеплен с геном *Yr36* (Brevis, Dubcovsky, 2010). Созданные почти изогенные и сестринские им линии BC₆F₃ были протестированы в трех пунктах в течение трех лет. Все линии с функциональными аллелями *Gpc-B1* имели больше белка в зерне и меньше азота в стеблях, при этом у них была ниже масса 1000 зерен, но по урожайности они не различались. Кроме того, у линий мягкой пшеницы с функциональными аллелями *Gpc-B1* увеличивались водопоглотительная способность муки, время замеса теста и объем хлеба; у линий твердой пшеницы улучшались качество клейковины и реологические свойства семялины, твердость спагетти и уменьшались потери сухого вещества при варке (Brevis et al., 2010).

Неоднозначные результаты были получены при оценке почти изогенных линий BC₅F₅ сортов яровой мягкой пшеницы Tara 2002 и Scarlet, адаптированных к условиям регионов с большим количеством осадков или с полупустынным климатом соответственно (Carter et al., 2012). В сравнении с родительскими сортами ускоренное старение было выявлено только в один год для линий Tara 2002, несущих функциональные аллели *Gpc-B1*, а также для таких линий обоих сортов в теплице, при оптимальных условиях роста и развития растений. Однако эти различия не повлияли на содержание белка в зерне. В другой год у тех же линий Tara 2002 наблюдали увеличение содержания белка на 0,5 %, при этом видимых симптомов старения не было обнаружено. В течение двух лет у всех линий с функциональными аллелями *Gpc-B1* отмечали уменьшение массы 1000 зерен, но ни по урожайности, ни по накоплению Mg, Cu и Zn, ни по содержанию азота и углерода в соломе и зерне линии не различались. Не выявив ожидаемого эффекта функциональных аллелей *Gpc-B1*, авторы связали этот факт с коротким периодом вегетации растений в регионе. Влияние разной продолжительности вегетации на проявление гена *Gpc-B1* требует дальнейшего изучения.

В Аргентине результаты проведенных исследований на почти изогенных линиях сортов яровой мягкой пшеницы ProINTA Grana и ProINTA Oasis дали основание заключить, что интрогрессия функциональных аллелей *Gpc-B1* – ценный ресурс для улучшения содержания белка в зерне (Tabbata et al., 2013).

В Индии были получены гомозиготные линии BC₃F₅/F₆ поколений с функциональными аллелями *Gpc-B1* на основе 10 сортов и линий мягкой пшеницы (Kumar et al., 2011). Донором аллелей была американская линия Yesoga Rojo. У 71 из созданных линий обнаружен высокий процент белка в зерне в трех пунктах выращивания без потери урожайности, но статистически значимого увеличения содержания белка в сравнении с рецессивными родительскими формами не показано. Лишь семь линий превосходили (содержание белка от 14,8 до 17,9 %) родительские формы в одном из трех пунктов выращивания или по объединенным данным и не снижали урожайность, высоту растений, продуктивную кустистость, число зерен

на колос, массу 1000 зерен. Успешным также оказалось объединение в одном генотипе функциональных аллелей *Gpc-B1* с эффективными генами *Lr24* и *Lr28*, контролирующими устойчивость к бурой ржавчине.

В Австралии были получены почти изогенные линии на основе полукарликовых сортов Wyalkatchem и Gladius и линии VR1128, адаптированных к средиземноморскому типу климата, характерному для южного и западного регионов пшеничного пояса Австралии (Eagles et al., 2014). Донорами функциональных аллелей *Gpc-B1* были канадские сорта Somerset и Burnside, которые также несут тесно сцепленные гены *Lr34/Yr18* устойчивости к бурой и желтой ржавчине. Оценка линий в поле в 13 различных пунктах в течение 2009–2011 гг. показала, что присутствие в генотипах линий функциональных аллелей *Gpc-B1* приводило к увеличению содержания белка в зерне и уменьшению массы 1000 зерен почти во всех пунктах изучения. При этом отдельные линии были вполне сопоставимыми с элитным сортом Mace по урожайности. Они незначительно, в сторону увеличения, отличались от него по массе 1000 зерен, не различались по датам колошения, а также обладали приемлемой натурной массой зерна. По мнению Н.А. Eagles с коллегами (2014), введение функциональных аллелей *Gpc-B1* в новые сорта может служить механизмом для частичного ослабления существующей отрицательной корреляции между урожайностью и содержанием белка.

Известно, что реакция на жару как стрессор проявляется в укорочении периода развития зерновки, ускорении старения верхнего междоузлия, снижении урожайности и изменении показателей качества клейковины. Особенно чувствителен к жаре синтез крахмала, что объясняет влияние стрессора на размер зерна и концентрацию в нем белка. Австралийские ученые провели опыты по выяснению действия высокой температуры на налив зерна у линий, несущих функциональные аллели *Gpc-B1* (Maphosa et al., 2014). Для этого использовали сорта Gladius, Drysdale, Wyalkatchem, Burnside, Somerset, Glupro и селекционную линию RAC1262A (отбор из линии RAC1262, которая впоследствии стала Gladius). Опыт проведен при большом числе повторностей в теплице в контролируемых условиях (24/18 °C, 14/10 ч день/ночь), через три дня после цветения половину растений каждого сорта и линии помещали в камеру (37/27 °C, 14/10 ч день/ночь) на 15 дней. Как показали результаты опыта, действие высокой температуры не оказало существенного влияния на фенотипическое проявление функциональных аллелей *Gpc-B1*.

Итак, к настоящему времени в мире сформировались и опробованы новые генетические ресурсы, с использованием которых показана возможность повышения содержания суммарного белка в зерне пшеницы без снижения урожайности, ухудшения качества и других хозяйственно ценных признаков. К этим ресурсам можно отнести:

- выявленные у разных видов пшеницы и эгилопса гены *Gpc-1* и *Gpc-2*, влияющие на накопление белка, цинка и железа в зерне, относящиеся к NAC-факторам транскрипции и участвующие в регуляции работы других генов;
- созданные в разных странах мира коммерческие сорта, разного типа генетические линии, мутанты, трансген-

ные растения, представляющие собой новый исходный материал для научных исследований и селекции;
– молекулярные маркеры, разработанные для идентификации функциональных и неактивных аллелей *Gpc*-генов, которые можно применять для генотипирования отдельных гибридных растений, линий, сортов, образцов разных видов *Triticum L.* и *Aegilops L.* и мониторинга передачи аллелей *Gpc* от донора к реципиенту.
Большой интерес для генотипирования с использованием молекулярных маркеров представляет сформированная в ВИР «стержневая» коллекция высокобелковых генетических источников. У них могут быть выявлены не только новые аллели генов *Gpc*, но и другие новые гены, ценные для селекции пшеницы.

Благодарности

В конце 2015 г. исполнилось 100 лет со дня рождения академика Василия Григорьевича Конарева. Эту статью мы посвящаем памяти нашего учителя. Созданная им в ВИРе научная школа внесла большой вклад в изучение генома клеточного ядра растений, познание природы белков семян и разработку принципов и методов белковых маркеров для геномного и генетического анализа растений, а также в решение проблем повышения качества зерна.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935.
Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчаннинова О.Д., Шитова И.П., Мережко А.Ф., Филатенко А.А. Пшеницы мира. Л.: ВО «Агропромиздат». Ленингр. отд-ние, 1987.
Дорофеев В.Ф., Якубцинер М.М., Семенова Л.В., Руденко М.И., Новикова М.В., Степанова Г.И., Охотникова Т.В., Шитова И.П. Высококачественные пшеницы. Каталог. Л., 1972;86.
Иванов Н.Н. Химический состав пшениц СССР. Результаты географических опытов 1923–1926. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1928-1929;XXI(4):47-320.
Иванов Н.Н. Проблема белка в растениеводстве. М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1947:21-30.
Иванов Н.Н., Княгиничев М.И. Биохимия пшеницы. Биохимия культурных растений. М.; Л.: Сельхозгиз, 1936;5-86.
Каталог образцов мировой коллекции ВИР с характеристикой содержания белка и аминокислот. Л., 1972;100.
Каталог мировой коллекции ВИР. Пшеницы с высоким и повышенным содержанием белка в зерне. Л., 1976;182.
Каталог мировой коллекции ВИР. Твердая пшеница (новейшие поступления с характеристикой технологических свойств зерна). Л., 1977a;203.
Каталог мировой коллекции ВИР. Высокобелковые пшеницы. Л., 1977b;215.
Каталог мировой коллекции ВИР. Виды рода *Triticum L.* (Характеристика образцов по содержанию белка и лизина в зерне). Л., 1983;364.
Каталог мировой коллекции ВИР. Пшеница. Комплексная оценка перспективных по качеству зерна образцов яровой мягкой пшеницы в условиях Центрально-Черноземного района России. Санкт-Петербург, 1999;698.
Каталог мировой коллекции ВИР. Пшеница. Технологические и агробиологические характеристики образцов яровой мягкой пшеницы в условиях различных регионов России. Санкт-Петербург, 2003;744.

Княгиничев М.И. Биохимия пшеницы. Л.: Сельхозгиз, 1951.
Конарев В.Г. Молекулярно-генетические аспекты оценки исходного материала на белок. Тр. по прикл. ботан., генет., селекции. 1975;54(1):163-172.
Конарев В.Г. Белки пшеницы. М.: Колос, 1980:193-214.
Конарев В.Г., Чмелева З.В. Характеристика мировых ресурсов пшеницы по содержанию в зерне белка и лизина и фонд высокобелковых пшениц. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1977;59(3):31-38.
Конарев В.Г., Чмелева З.В., Мойса И.И. Состав, структура и свойства клейковины разного происхождения. Бюлл. ВИР. 1979;92:69-75.
Крупнов В.А., Крупнова О.В. Генетическая архитектура содержания белка в зерне пшеницы. Генетика. 2012;48(2):140-159.
Покровская Н.Ф. Количественный и качественный состав белка и крахмала мягких пшениц в зависимости от районов выращивания. Вестн. с.-х. науки. 1967;6:37-44.
Покровская Н.Ф., Хорева В.И. Содержание лизина и триптофана в зерне пшениц разной ploidy. Докл. ВАСХНИЛ. 1971;11:8-11.
Тютюрев С.Л., Чмелева З.В., Мойса И.И., Дорофеев В.Ф. Изучение содержания белка и незаменимых аминокислот в зерне видов пшеницы и их диких сородичей. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1973;1:222-241.
Флякбергер К. Белок в зерне пшениц земного шара. Социалистическое растениеводство. 1932;1:15-31.
Якубцинер М.М., Покровская Н.Ф. Биохимическая характеристика зерна тетраплоидных пшениц. С.-х. биология. 1969;IV(3):348-357.
Якубцинер М.М., Покровская Н.Ф. Биохимическая характеристика зерна гексаплоидных пшениц. С.-х. биология. 1971a;VI(1):22-28.
Якубцинер М.М., Покровская Н.Ф. Биохимическая характеристика зерна диплоидных пшениц. С.-х. биология. 1971b;VI(5):669-675.
Asplund L., Bergkvist G., Leino M.W., Westerbergh A., Weih M. Swedish spring wheat varieties with the rare high grain protein allele of *NAM-B1* differ in leaf senescence and grain mineral content. PLoS ONE. 2013;8(3):e59704. DOI 10.1371/journal.pone.0059704.
Asplund L., Hagenblad J., Leino M.W. Re-evaluating the history of the wheat domestication gene *NAM-B1* using historical plant material. J. Archaeol. Sci. 2010;37:2303-2307. DOI 10.1016/j.jas.2010.04.003.
Avivi L. High protein content in wild tetraploid *Triticum dicoccoides* Korn. Proc. 5th Intern. Wheat Genetic Symp. Ed. S. Ramanujam. Indian Society of Genetics and Plant Breeding, New Delhi, India. 1978:372-380.
Avni R., Zhao R., Pearce S., Jun Y., Uauy C., Tabbita F., Fahima T., Slade A., Dubcovsky J., Distelfeld A. Functional characterization of *GPC-1* genes in hexaploid wheat. Planta. 2014;239:313-324. DOI 10.1007/s00425-013-1977-y.
Aykut Tonk F., Lker E., Tosun M. A study to incorporate high protein content from tetraploid wheat (*T. turgidum dicoccoides*) to hexaploid wheat (*T. aestivum vulgare*). Turk. J. Field Crops. 2010;15(1):69-72.
Balfourier F., Roussel V., Strelchenko P., Exbrayat-Vinson F., Sourdille P., Boutet G., Koenig J., Ravel C., Mitrofanova O., Beckert M., Charvet G. A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. Theor. Appl. Genet. 2007;114:1265-1275. DOI 10.1007/s00122-007-0517-1.
Balyan H.S., Gupta P.K., Kumar S., Dhariwal R., Jaiswal V., Tyagi S., Agarwal P., Gahlaut V., Kumari S. Genetic improvement of grain protein and other health-related constituents of wheat grain. Plant Breeding. 2013. available at <http://wileyonlinelibrary.com>. DOI 10.1111/pbr.12047.
Brevis J.C., Dubcovsky J. Effects of the chromosome region including the *Gpc-B1* locus on wheat grain and protein yield. Crop Sci. 2010;50:93-104. DOI 10.2135/cropsci2009.02.0057.
Brevis J.C., Morris C.F., Manthey F., Dubcovsky J. Effect of the grain protein content locus *Gpc-B1* on bread and pasta quality. J. Cereal Sci. 2010;51:357-365. DOI 10.1016/j.jcs.2010.02.004.

- Cantrell R.G., Joppa L.R. Genetic analysis of quantitative traits in wild emmer (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Crop Sci.* 1991;31(3):645-649.
- Cantu D., Pearce S.P., Distelfeld A., Christiansen M.W., Uauy C., Akhunov E., Fahima T., Dubcovsky J. Effect of the down-regulation of the high *Grain Protein Content* (*GPC*) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence. *BMC Genomics.* 2011;12:492-509. DOI 10.1186/1471-2164-12-492.
- Carter A.H., Santra D.K., Kidwell K.K. Assessment of the effects of the *Gpc-B1* allele on senescence rate, grain protein concentration and mineral content in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from the Pacific Northwest region of the USA. *Plant Breeding.* 2012; 131:62-68. DOI 10.1111/j.1439-0523.2011.01900.x.
- Cormier F., Throude M., Ravel C., Le Gouis J., Leveugle M., Lafarge S., Exbrayat F., Duranton N., Praud S. Detection of NAM-A1 natural variants in bread wheat reveals differences in haplotype distribution between a worldwide core collection and European elite germplasm. *Agronomy.* 2015;5:143-151. DOI 10.3390/agronomy5020143.
- DePauw R.M., Knox R.E., Humphreys D.G., Thomas J.B., Fox S.L., Brown P.D., Singh A.K., Proznik C., Randhawa H.S., Fowler D.B., Graf R.J., Hucl P. New breeding tools impact Canadian commercial farmer fields. *Czech. J. Genet. Plant.* 2011;47:28-34.
- DePauw R.M., Townley-Smith T.F., Humphreys G., Knox R.E., Clarke F.R., Clarke J.M. Lillian hard red spring wheat. 2004. available at <http://www.pgdc.ca/pdfs/wrt/cultivardescriptions/Lillian.pdf>.
- Distelfeld A., Cakmak I., Peleg Z., Ozturk L., Yazici A.M., Budak H., Saranga Y., Fahima T. Multiple QTL-effects of wheat *Gpc-B1* locus on grain protein and micronutrient concentrations. *Physiol. Plantarum.* 2007;129:635-643. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00841.x.
- Distelfeld A., Pearce S.P., Avni R., Scherer B., Uauy C., Piston F., Slade A., Zhao R., Dubcovsky J. Divergent functions of orthologous NAC transcription factors in wheat and rice. *Plant Mol. Biol.* 2012; 78:515-524. DOI 10.1007/s11103-012-9881-6.
- Distelfeld A., Uauy C., Fahima T., Dubcovsky J. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytol.* 2006;169:753-763. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01627.x.
- Distelfeld A., Uauy C., Olmos S., Schlatter A.R., Dubcovsky J., Fahima T. Microcolinearity between a 2-cM region encompassing the grain protein content locus *Gpc-6B1* on wheat chromosome 6B and f 350-kb region on rice chromosome 2. *Funct. Integr. Genomics.* 2004;4:59-66. DOI 10.1007/s10142-003-0097-3.
- Dubcovsky J., Fahima T., Uauy C., Distelfeld A. NAC from wheat for increasing grain protein content. United States Patent No.: US 7820882B2. Oct. 26, 2010. available at <https://books.google.com.tr/patents/US7820882>.
- Eagles H.A., McLean R.B., Eastwood R.F., Appelbee M.-J., Cane K., Martin P.J., Wallwork H. High-yielding lines of wheat carrying *Gpc-B1* adapted to Mediterranean-type environments of the south and west of Australia. *Crop Pasture Sci.* 2014;65(9):854-861. <http://dx.doi.org/10.1071/cp14106>.
- Fox S.L., Townley-Smith T.F., Humphreys D.G., McCallum B.D., Fetch T.G., Gaudet D.A., Gilbert J.A., Menzies J.G., Noll J.S., Howes N.K. Somerset hard red spring wheat. 2005. available at <http://www.pgdc.ca/pdfs/wrt/cultivardescriptions/Somerset.pdf>.
- Fu D., Uauy C., Blechl A., Dubcovsky J. RNA interference for wheat functional gene analysis. *Transgenic Res.* 2007;16:689-701. DOI 10.1007/s11248-007-9150-7.
- Hagenblad J., Aspland L., Balfourier F., Ravel C., Leino M.W. Strong presence of the high grain protein content allele NAM-B1 in Fennoscandian wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125:1677-1686. DOI 10.1007/s00122-012-1943-2.
- Hale I., Zhang X., Fu D., Dubcovsky J. Registration of wheat lines carrying the partial stripe rust resistance gene *Yr36* without the *Gpc-B1* allele for high grain protein content. *J. Plant Regist.* 2012;7(1): 108-112.
- Hu X.-G., Wu B.-H., Liu D.-C., Wei Y.-M., Gao S.-B., Zheng Y.-L. Variation and their relationship of *NAM-G1* gene and grain protein content in *Triticum timopheevii* Zhuk. *J. Plant Physiol.* 2013;170: 330-337. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.10.009>.
- Hu X.-G., Wu B.-H., Yan Z.-H., Dai S.-F., Zhang L.-Q., Liu D.-C., Zheng Y.-L. Characteristics and polymorphism of NAM gene from *Aegilops* section *sitopsis* species. *Afr. J. Agric. Res.* 2012;7(37): 5252-5258. DOI 10.5897/AJAR12.078.
- Humphreys D.G., Townley-Smith T.F., Lukow O., McCallum B., Gaudet D., Gilbert J., Fetch T., Menzies J., Brown D., Czarniecki E. Burnside extra strong hard red spring wheat. 2009. Available at <http://www.pgdc.ca/pdfs/wrt/cultivardescriptions/Burnside.pdf>.
- Hussein H.A., Ebtissam H.A.H., El-Sayed O.E., Al-Ansary A.M.F., Khatab S.A., Sally A.A.R. Inter specific crosses and marker assisted selection for improving the nutritional value of Egyptian wheat cultivars. *Int. J. Agric. Res.* 2014;9(3):119-135. DOI 10.3923/ijar.2014.113.135.
- Johnson V.A. Wheat Protein. *Basic Life Sci.* 1976; Mar 1-7;8:371-385.
- Johnson V.A., Mattern P.J., Peterson C.J., Kuhr S.L. Improvement of wheat protein by traditional breeding and genetic techniques. *Cereal Chem.* 1985;62(5):350-355.
- Joppa L.R., Cantrell R.G. Chromosomal location of genes for grain protein content of wild tetraploid wheat. *Crop Sci.* 1990;30:1059-1064. DOI 10.2135/cropsci1990.0011183X003000050021x.
- Joppa L.R., Du C., Hart G.E., Hareland G.A. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci.* 1997;37:1586-1589. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700050030x.
- Kade M.A., Barneix J., Olmos S., Dubcovsky J. Nitrogen uptake and remobilization in tetraploid Langdon durum wheat and a recombinant substitution line with the high grain protein gene *Gpc-B1*. *Plant Breeding.* 2005;124:343-349. DOI 10.1111/j.1439-0523.2005.01110.x.
- Khan I.A., Procinier J.D., Humphreys D.G., Tranquilli G., Schlatter A.R., Marcucci-Poltri S., Froberg R., Dubcovsky J. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* transferred to bread wheat. *Crop Sci.* 2000;40:518-524.
- Klindworth D.L., Hareland G.A., Elias E.M., Faris J.D., Chao S., Xu S.S. Agronomic and quality characteristics of two new sets of Langdon durum-wild emmer wheat chromosome substitution lines. *J. Cereal Sci.* 2009;50:29-35. DOI 10.1016/j.jcs.2009.02.003.
- Kumar J., Jaiswal V., Kumar A., Kumar N., Mir R.R., Kumar S., Dhariwal R., Tyagi S., Khandelwal M., Prabhu K.V., Prasad R., Balyan H.S., Gupta P.K. Introgression of a major gene for high grain protein content in some Indian bread wheat cultivars. *Field Crop. Res.* 2011;123:226-233. DOI 10.1016/j.fcr.2011.05.013.
- Maphosa L., Collins N.C., Taylor J., Mather D.E. Post-anthesis heat and *Gpc-B1* introgression have similar but non-additive effects in bread wheat. *Funct. Plant Biol.* 2014;41:1002-1008. <http://dx.doi.org/10.1071/FP14060>.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12th Intern. Wheat Genetics Symp. 8-13 September 2013;Yokohama, Japan. available at <http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>.
- Mesfin A., Froberg R., Anderson J.A. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat. *Crop Sci.* 1999;39(2): 508-513.
- Mishra V.K., Gupta P.K., Arun B., Chand R., Vasistha N.K., Vishwakarma M.K., Yadav P.S., Joshi A.K. Introgression of a gene for high grain protein content (*Gpc-B1*) into two leading cultivars of wheat in Eastern Gangetic Plains of India through marker assisted back-cross breeding. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 2015;7(8):292-300. DOI 10.5897/JPBCS2015.0514.
- Olmos S., Distelfeld A., Chicaiza O., Schlatter A.R., Fahima T., Echenique V., Dubcovsky J. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2003;107: 1243-1251. DOI 10.1007/s00122-003-1377-y.

- Olsen A.D., Ernst H.A., Leggio L.L., Skriver K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.* 2005;10(2):79-87. DOI 10.1016/j.tplants.2004.12.010.
- Pearce S., Tabbita F., Cantu D., Buffalo V., Avni R., Vazques-Gross H., Zhao R., Conley C.J., Distelfeld A., Dubcovsky J. Regulation of Zn and Fe transporters by the GPC1 gene during early wheat monocarpic senescence. *Plant Biol.* 2014;14:368-391. DOI 10.1186/s12870-014-0368-2.
- Podzimska-Sroka D., O'Shea C., Gragersen P.L., Skriver K. NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops. *Planta.* 2015;4:412-448. DOI 10.3390/plants4030412.
- Puranik S., Sahu P.P., Srivastava P.S., Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2012;17(6):369-381. DOI 10.1016/j.tplants.2012.02.004.
- Rahaie M., Xue G-P., Schenk P.M. The role of transcription factors in wheat under different abiotic stresses. 2013; <http://dx.doi.org/10.5772/54795>.
- Randhawa H.S., Asif M., Pozniak C., Clarke J.M., Graf R.J., Fox S.L., Humphreys C., 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. DOI 10.1111/pbr.12057.
- Shewry P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J. Cereal Sci.* 2007;46:239-250. DOI 10.1016/j.jcs.2007.06.006.
- Tabbita F., Lewis S., Vouilloz J.P., Ortega M.A., Kade M., Abbate P.E., Barneix A.J. Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breeding.* 2013;132:48-52. DOI 10.1111/pbr.12011.
- Uauy C., Brevis J.C., Dubcovsky J. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *J. Exp. Bot.* 2006a;57(11):2785-2794. DOI 10.1093/jxb/erl047.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubkovsky J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zink, and iron content in wheat. *Science.* 2006b;314:1298-1301.
- Vishwakarma M.K., Mishra V.K., Gupta P.K., Yadav P.S., Kumar H., Joshi A.K. Introgression of the high grain protein gene *Gpc-B1* in an elite wheat variety of Indo-Gangetic Plains through marker assisted backcross breeding. *Curr. Plant Biol.* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpb.2014.09.003>.
- Waters B.M., Uauy C., Dubcovsky J., Grusak A. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zink, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Exp. Bot.* 2009;60(15):4263-4274. DOI 10.1093/jxb/erp257.
- Wheat Applied Genomics. MASWheat Quality traits. High grain protein content. Available at <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/HGPC/index.htm>.

Применение достижений генетики в селекции плодовых культур: вклад Мичуринского отделения Вавиловского общества генетиков и селекционеров

Н.И. Савельев, Н.Н. Савельева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина», Мичуринск, Россия

В работе представлен обзор исследований, проводимых по частной генетике ведущих плодовых культур (яблоня, груша, вишня). Приведены литературные данные и результаты, полученные специалистами Мичуринского отделения ВОГиС, по изучению и идентификации генов устойчивости к грибным болезням и признакам, определяющих качество плодов, закономерностей наследования устойчивости к низким температурам. Показан опыт использования гибридологического анализа и ДНК-маркирования для выявления генотипов, несущих целевые аллели генов колонновидности яблони (*Co*), карликовости груши (*PcDw*), слаборослости вишни (*O₂*). Показано, что молекулярные маркеры не всегда дают надежные результаты для выявления колонновидного габитуса у сеянцев яблони. На основе молекулярно-генетического анализа исходных форм и гибридных сеянцев яблони выделены генотипы, содержащие целевые аллели генов моногенной устойчивости к парше *Rvi6*, в том числе с гомозиготным генотипом (*Rvi6*), а также с аллелями генов, вовлеченных в контроль биосинтеза этилена (*Md-ACS1* и *Md-ACO1*) и экспансина (*Md-Exp7*) в плодах, определяющих их длительную лежкость и твердость мякоти. Созданы новые высокопродуктивные зимостойкие сорта груши, характеризующиеся комплексной устойчивостью к болезням, длительной лежкостью (до восьми месяцев) и высоким качеством плодов. Впервые идентифицированы гены, контролирующие устойчивость вишни к коккомикозу (*Coccomyces hiemalis* Higg.) (*A*), слаборослость вишни (*O₂*), терпкость (*Ta*) и сочность (*Su*) мякоти плодов груши. В результате проведенных исследований в Государственный реестр селекционных достижений включено 35 сортов яблони, 20 – груши, 8 – вишни.

Ключевые слова: плодовые культуры; яблоня; груша; вишня; наследование; идентификация генов; ДНК-маркеры; селекция; сорта; колонновидность; устойчивость к болезням; устойчивость к низким температурам.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Савельев Н.И., Савельева Н.Н. Применение достижений генетики в селекции плодовых культур: вклад Мичуринского отделения Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):555-562. DOI 10.18699/VJ16.178

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Savel'ev N.I., Savel'eva N.N. Using achievements of fruit crop genetics and breeding: a contribution from the Michurinsk Department of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):555-562. DOI 10.18699/VJ16.178

УДК 634.1:631.523/527

Поступила в редакцию 11.04.2016 г.

Принята к публикации 27.06.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

Using achievements of fruit crop genetics and breeding: a contribution from the Michurinsk Department of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders

N.I. Savel'ev, N.N. Savel'eva

I.V. Michurin All-Russian Scientific Institute for Genetic and Breeding of Fruit Plants, Michurinsk, Russia

The Michurinsk Department of the Vavilov Society of Geneticists and Breeding Scientists (VOGiS) was formed in 1966 after the constituent congress of VOGiS and nowadays includes 54 members. The scientists are engaged in 4 scientific institutions affiliated with FASO of Russia. The paper presents investigations of the individual genetics of leading fruit crops (pear, cherry, apple), identified genes, regularities of inheriting resistance to low temperatures, the most harmful diseases and several characters responsible for fruit quality. Some genes were identified for the first time. These are genes regulating *Coccomyces hiemalis* Higg. resistance (*A*), retarded growth habit in cherry (*O₂*), astringency (*Ta*) and juiciness (*Su*) of fruit in pear. On the base of hybridological analysis and DNA marking, genotypes were identified. These genotypes carry target alleles of the following genes: columnar growth habit (*Co*) in apple, dwarf trait (*PcDw*) in pear, retardant growth (*O₂*) in cherry. It was found that the markers C18470-25831, Mdo.chr 10.12, Co04R12 do not always show robust results for screening of young apple seedlings with columnar growth habit (*Co*) because they are identified as non-columnar forms. The primer pairs of 29f1 и jwi1r are the most robust ones for identification of columnar genotypes. These primers amplify specific PCR product of 586 bp (5'CR). On the basis of molecular-genetic analysis of apple initial forms and hybrid seedlings, there were identified targeted alleles of monogenic scab resistance genes including dominant homozygous genotype (*Rvi6Rvi6*) and also alleles of genes involved in the control of the biosynthesis of ethylene (*Md-ACS1* and *Md-ACO1*) and expansin (*Md-Exp7*) controlling fruit long shelf life and pulp firmness.

Key words: fruit crops, apple, pear, cherry, inheritance, gene identification, DNA-markers, breeding, varieties, columnar tree type, disease resistance, cold tolerance.

Плоды являются важнейшей и незаменимой составной частью качественного, рационального питания, обеспечивают здоровье и долголетие человека. В настоящее время в мире производится более 120 млн т плодов яблони, груши, вишни и других плодовых культур. В России в 2013 г. собрано 1,57 млн т яблок, 70 тыс. т груш и 200 тыс. т вишни и черешни (www.faostat.fao.org). Более 77 % урожая приходится на хозяйства населения, 4,2 % – малые предприятия и около 20 % – сельскохозяйственные организации. Уровень самообеспеченности россиян плодами в 2013 г. составил 32,5 %.

Важнейшим условием повышения экономической эффективности садоводства является постоянное совершенствование сортового состава. К настоящему времени в России в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, внесено 410 сортов яблони, 151 – груши, 95 – вишни. Однако не все сорта в полной мере отвечают современным требованиям, и предел улучшения их потенциальных возможностей пока еще не достигнут. Новые сорта должны иметь преимущества перед существующими аналогами по продуктивности, устойчивости к абиотическим и биотическим стрессорам, качеству плодов, отличаться новизной, конкурентоспособностью и быстрой окупаемостью (Седов, 2011; Савельева, 2016).

В настоящее время приоритетной задачей является создание сортов плодовых культур с генетической устойчивостью к наиболее вредоносным заболеваниям. Возделывание таких сортов позволит снизить пестицидную нагрузку, энергозатраты, улучшить экологическую обстановку и получать экологически безопасную продукцию для потребления в свежем виде и производства продуктов питания, в том числе на основе органического производства (Савельева, 2016). В Швейцарии на базе иммунных к болезням сортов производится около 40 % органической продукции (Gessler, Pertot, 2012). Для закладки суперинтенсивных, особенно сырьевых, садов заслуживают внимания колонновидные сорта (Tobutt, 1985; Кичина, 2006; Jacob, 2010; Савельева, Савельева, 2012).

Успешное решение селекционных задач по совершенствованию сортимента плодовых культур неразрывно связано с комплексной оценкой биологического и генетического потенциала исходных форм по важнейшим селекционно значимым признакам; совершенствованием методов селекции, базирующихся на знании закономерностей наследования качественных и количественных признаков, характера взаимодействия генов, комбинационной способности родительских форм (Савельева, 2016). Одним из путей интенсификации селекционного процесса плодовых культур является использование современных молекулярно-генетических методов анализа генома исходных форм на основе ДНК-маркеров.

Использование ДНК-маркеров в селекции выводит ее на качественно новый уровень, позволяя вести скрининг по хозяйственно значимым признакам на начальных стадиях селекционного процесса по аллелям хозяйственно важных генов, а не по фенотипическому проявлению. Это дает возможность ускорить процесс получения новых генотипов и сократить площади экспериментального материала, что в конечном итоге приводит к экономии

трудовых и материальных ресурсов (Beckmann, Soller, 1986; Tartarini et al., 1999; Xu, Crouch, 2008; Moriya et al., 2012; Хлесткина, 2011; Савельева, 2016).

Мичуринское отделение Вавиловского общества генетиков и селекционеров берет свое начало с 1966 г., после Учредительного съезда ВОГиС, и в настоящее время объединяет 54 члена, которые трудятся в четырех научных учреждениях ФАНО России.

В обзоре представлены обобщенные сведения по использованию достижений генетики в селекции наиболее распространенных в России плодовых культур (яблони, груши, вишни) и вклад ученых Мичуринского отделения ВОГиС в генетико-селекционные исследования этих культур.

Яблоня (*Malus*)

Яблоня, как и большинство плодовых культур, является сложным объектом для генетических исследований вследствие продолжительности ювенильного периода, гетерозиготности по многим наследственным факторам и высокой степени самонесовместимости. К настоящему времени у яблони идентифицировано 145 генов, из которых более 70 контролируют хозяйственно ценные признаки (Alston et al., 2000).

Ранние исследования, проведенные на различных видах и сортах яблони, позволили установить генетический контроль и идентифицировать ряд генов устойчивости к парше: V_f (*Malus floribunda* 821), V_m (*M. micromalus* 245-38), V_a (Антоновка P1172612), V_b (*M. baccata* Dolgo), V_{bj} (*M. baccata jacksonii* Dg R 27 T 1), V_r (Russian seedling R 127407A) (Dayton, Williams, 1968).

Анализ гибридных семян выявил доминантные гены устойчивости к другим заболеваниям и вредоносным насекомым: $Bp-1$, $Bp-2$ (устойчивость к горькой ямчатости плодов), Gb (горькая гниль яблок), $Ps-1$, $Ps-2$ (восприимчивость к пятнистости), $Er-1$ (кровяная тля), $Sd-1$, $Sd-2$, $Sd-3$ (устойчивость к разным биотипам красногалловой тли), $Sm-h$ (сверхчувствительность к подорожниковой тле) (Alston et al., 2000).

Идентификация гена колонновидности (Co) у клона Мекинтош «Важак» открыла принципиально новые возможности в селекции яблони по созданию сортов с колонновидным габитусом роста и потенциальной продуктивностью более 400 т/га (Tobutt, 1985; Кичина, 2006).

Имеются достижения по генетике признаков, определяющих качество плодов, что позволяет целенаправленно вести селекцию на окраску, кислотность, текстуру мякоти и их биохимический состав. Рядом авторов было показано, что антоциановая покровная окраска плодов определяется доминантным геном Rf , оржавленность – геном Ru , а аромат плодов у сорта Фиеста контролируется геном Ar (Sampson, Cameron, 1965; Alston, Watkins, 1975). Кислотность плодов яблони определяется геном Ma и детерминируется в потомстве моногенно, при этом для сортов Акеро, Балдер, Боровинка, Бойкен и Ингрид Мария был установлен гомозиготный генотип по данному гену (Brown, Narwey, 1971; Савельев, 1998).

В последние годы для генов, контролирующих устойчивость к парше (V_m , V_f и др.), мучнистой росе (Pl_1 , Pl_2 , Pl_d , Pl_w), красногалловой тле (Sd), колонновидный габитус

кроны (*Co*), биосинтез этилена и экспансина в плодах (*Md-ACO1*, *Md-ACSI*, *MD-Exp7*), и ряда других генов были разработаны диагностические ДНК-маркеры (Tartarini et al., 1999; Cevik, King, 2002; Evans, James, 2003; Afunian et al., 2004; Costa et al., 2005, 2008; Patocchi et al., 2005; Bai, 2012; Baldi et al., 2013; Velasco et al., 2010).

Наиболее изученным признаком является устойчивость яблони к парше, для которого к настоящему времени идентифицировано 17 генов, обозначенных *Rvi* (Bus et al., 2009, 2011; Урбанович, 2013). Главные гены устойчивости локализованы в 8 хромосомах из 17, при этом 6 генов картированы в хромосоме 2 (Bus et al., 2011). Ген *Rvi6* ($=V_r$), наиболее распространенный в новых иммунных к парше сортах, расположен в хромосоме 1 (Maliepaard et al., 1998) и в гомозиготном состоянии может существенно повышать устойчивость к парше (Gessler et al., 1997; Tartarini et al., 2000). В дальнейших исследованиях в данной хромосоме был идентифицирован кластер из четырех рецептор-подобных генов, которые были обозначены как *Rvi6-1*, *Rvi6-2*, *Rvi6-3* и *Rvi6-4* (Vinatzer, 2001; Afunian et al., 2004; Gessler, Pertot, 2012).

Использование молекулярных маркеров для выявления в генетической коллекции, состоящей из 130 генотипов яблони, различных генов устойчивости к парше показало, что SCAR-маркер OPL19, сцепленный с геном *Rvi2* (2), был идентифицирован в генотипах 81 образца яблони (Урбанович, 2013). Применение SCAR-маркера AD13 позволило выявить локус *Rvi4* (*Vf4*) в геноме 34 форм. Ген *Rvi5* (V_m) был идентифицирован с помощью маркера OPB12 в сортах Мекинтош, Орловим, Первинка и формах SR 0523, 84-39/58 и 84-50/9. В этой же работе с помощью маркеров *VfC*, AL07 и AM19 было установлено, что все иммунные к парше сорта яблони, созданные во Франции, США, Польше, России и Республике Беларусь на основе гена *Rvi6* от *M. floribunda* 821, действительно содержали в своем генотипе этот ген, причем у сортов Фридом и Джонафри он находится в гомозиготном состоянии.

Проведенный методом ДНК-маркирования анализ 279 сортов и генотипов яблони на наличие генов устойчивости к парше в Чехии (НИИ помологии, Головоусы) показал, что в 22 иммунных к парше сортах с геном *Rvi6* были обнаружены гены *Rvi15* и V_n *Rvi2*, причем эти результаты по сортам Флорина, Джонафри, Отава, Редфри, Релинда, Топаз, Витос совпали с данными, приведенными в работе О.Ю. Урбанович (2013). Однако изученные сорта яблони с геном *Rvi6* не несли в своем генотипе гены *Rvi5* и *Rvi11*, а сорта Анголд, Дукал, Ромус-1 еще и гена *Rvi6* (Patzak et al., 2011). В результате ДНК-маркерного анализа было подтверждено наличие гена *Rvi6* в генотипе устойчивых к парше сортов Афродита, Василиса, Солнышко, Союз, Рассвет, Фортуна, а гена *Rvi5* – в сортах Первинка, Орловский пионер (Ульяновская, 2011).

Проведенный нами анализ сортов и гибридных сеянцев на присутствие в генотипе гена устойчивости к парше *Rvi6* с использованием маркера *VfC* подтвердил наличие гена *Rvi6* у сортов Былина, Чародейка, Красуля, Свежесть, Кандиль орловский, Академик Казаков, Топаз, Дьямант, Прима, Рождественское, полученных на основе родительских форм, производных клона *M. floribunda* 821 (Савельева, 2016). Маркерный анализ не выявил гена *Rvi6*

в сорте Памяти Нестерова, хотя он получен от скрещивания иммунного к парше сорта Летнее иммунное с Галой. Аналогично в колонновидном сорте Стрела, также полученном от гибридизации иммунной к парше формы 25-12 (Прима × Бессемянка мичуринская) с колонной 69-157, отсутствует ген *Rvi6*. Не обнаружено гена *Rvi6* и в геноме сортов Антоновка обыкновенная, Лобо, колоннах Гейзер, Стела и элитной форме 40-10. Этот ген присутствует в других иммунных к парше сортах: Благовест, Вымпел, Скала, Флагман, Имант, Фрегат, Фридом, Галарина, Успенское.

Для анализа сортов и гибридных сеянцев яблони нами был использован кодоминантный SCAR-маркер AL07, амплифицирующий в генотипах содержащие и несодержащие ген *Rvi6* фрагменты размером 570 и 823 п. н. соответственно (Patrascu et al., 2006). Как показали наши исследования (Доп. материалы 1¹), сорта Благовест, Скала, Флагман, Вымпел, Имант, Фрегат, Галарина содержат ген *Rvi6* в гетерозиготном состоянии. Аналогичное аллельное состояние этого гена выявлено у сортов Былина, Чародейка, Красуля, Кандиль орловский, Академик Казаков, Дьямант, Прима, Рождественское, Успенское, Валюта и Белорусское сладкое (Савельева, 2016). Американский сорт Фридом имеет гомозиготный генотип по гену *Rvi6*, что согласуется с результатами О.Ю. Урбанович (2013).

На основе анализа продуктов амплификации геномной ДНК гибридных сеянцев яблони из комбинации Кандиль орловский × Былина с праймером AL07 идентифицированы генотипы, гомозиготные и гетерозиготные по гену *Rvi6*, а также образцы, не содержащие этот ген (Доп. материалы 2). На представленной электрофореграмме показано, что в сортах Кандиль орловский, Былина и гибридных сеянцах № 3, 4, 5, 6, 8, 13, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 24 амплифицируются два фрагмента (823 и 570 п. н.), что предполагает гетерозиготное состояние гена *Rvi6*; образцы № 2, 10, 11, 12 оказались гомозиготными по гену *Rvi6*, и сеянец № 21, по-видимому, не содержит данного гена.

В последние годы интенсивно развиваются исследования по разработке молекулярно-генетических методов оценки колонновидного габитуса роста у яблони. Для идентификации гена колонновидного габитуса роста (*Co*) нами были использованы маркеры C18470-25831, Mdo.chr 10.12, Co04R12, 29f1 и jwi1r, разработанные зарубежными исследователями (Bai, 2012; Moriga et al., 2012; Baldi et al., 2013; Wolters et al., 2013).

Оценка восьми колонновидных и четырех неколонновидных сортов яблони с помощью маркера C18470-25831 показала, что у сортов Валюта, Готика, Зеленый шум, Телеймон действительно амплифицируется фрагмент размером 169 п. н., подтверждающий наличие гена *Co* (колонновидности). Однако фрагмент такой же длины был обнаружен и у неколонновидных сортов Боллер Мекинтош, Топаз, Голден Делишес и Голден Спур. Аналогичные результаты получены при использовании маркера Mdo.chr 10.12: у колонновидных сортов Валюта, Готика, Зеленый шум, Телеймон амплифицируется фрагмент размером 272 п. н., указывающий на наличие гена колонновидности, однако фрагмент такой же длины амплифицировался у неколонновидных сортов Боллер

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 2 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20-4/appx3.pdf>

Мекинтош, Топаз, Голден Делишес и Голден Спур и не амплифицировался у колонновидных – Приокское, Гейзер, Каскад. Фрагмент размером 194 п. н. амплифицировался при использовании маркера Co04R12 как у колонновидных сортов, так и у сортов Академик Казаков, Лобо, Белорусское сладкое, Успенское с обычным неколонновидным габитусом роста.

Таким образом, изученные ДНК-маркеры не всегда надежны при скрининге генотипов с колонновидным габитусом кроны. Наиболее надежными для маркер-ориентированной селекции на колонновидность оказались праймеры 29f1 и jw11g, которые детектируют в геноме колонновидных сортов яблони инсерции в локусе *Co* по наличию у фрагмента размером 586 п. н. (Wolters et al., 2013). С использованием данных праймеров нами у сортов Малюха, Президент, Васюган, Есения, Кумир, Останкино, Янтарное ожерелье, Триумф, Поэзия, Созвездие, Московское ожерелье, а также гибридных форм 3-19, 11-6-2, 32-26(к), 33-57, 18-2(к), 10-32, 10-7, 10-4, 10-18, 77-88(3), 8-12, 10-16, 32-35(к) с колонновидным габитусом роста был выявлен фрагмент длиной 586 п. н., что указывает на присутствие доминантного аллеля гена колонновидности (Доп. материалы 3).

У сортов Хани крисп, Богатырь, Антоновка зимняя, Антоновка красная, Антоновка каменичка, Свежесть, Жигулёвское, Беркутовское, Вымпел, Ренет Семеренко, Лобо, обладающих неколонновидным габитусом роста, диагностический фрагмент, указывающий на присутствие в геноме инсерции, отсутствует. Этот фрагмент также амплифицируется у колонновидных сортов Стрела, Каскад, Гейзер, Зеленый шум, Готика, Приокское (данные не приводятся).

Одним из факторов, влияющих на продолжительность хранения плодов яблони, является интенсивность биосинтеза этилена. Ингибирование эндогенного и экзогенного этилена способствует повышению сроков хранения и качества плодов (Knee, Hatfield, 1981). Для диагностики гена биосинтеза этилена был разработан маркер *Md-ACS* (Costa et al., 2005), использованный нами для генотипирования сортов яблони.

Изучение полиморфизма сортов и форм яблони по структурному гену биосинтеза этилена *Md-ACSI* показало, что сорта Старк спур Голден Делишес, Вымпел, Имант и форма 40-10 гомозиготны по аллелю 1 (*Md-ACSI-1/1*). Сорта Голден Делишес, Голден Спур, Хани крисп, Лигол, Памяти Нестерова, Гала, Академик Казаков, Редкрафт, Бреберн содержат ген *Md-ACSI* в гетерозиготном состоянии (*Md-ACSI-1/2*) (Доп. материалы 4). Сорт Фуджи гомозиготен по дефектному аллелю 2 (*Md-ACSI-2/2*).

Сорта Голден Делишес, Голден Спур, Хани крисп, Лигол, Памяти Нестерова, Гала, Академик Казаков, Старк Спур Голден Делишес, Вымпел, Имант, Редкрафт, Бреберн и форма 40-10 содержат другой структурный ген биосинтеза этилена, *Md-ACO1*, в гетерозиготном состоянии (данные не приводятся). Сорт Фуджи гомозиготен по дефектному аллелю *Md-ACO1-1*.

Сочетание аллельных вариантов генов *Md-ACSI-2/2* и *Md-ACO1-1/1*, детерминирующих минимальный уровень биосинтеза этилена, идентифицировано только у японского сорта Фуджи. Сорта Голден Делишес, Голден

Спур, Хани крисп, Лигол, Памяти Нестерова, Гала, Академик Казаков, Редкрафт, Бреберн содержат целевые гены в гетерозиготном состоянии (*Md-ACSI-1/2*; *Md-ACO1-1/2*) и характеризуются средним уровнем биосинтеза этилена в плодах. У сортов Старк спур Голден Делишес, Вымпел, Имант и формы 40-10 отмечено сочетание гомозиготного состояния аллеля *Md-ACSI-1/1* гена *Md-ACSI* с гетерозиготностью по гену *Md-ACO1*, что приводит к незначительному снижению интенсивности биосинтеза этилена относительно нормального уровня (Савельева, 2016).

Оценка генетического полиморфизма сортов и форм яблони с длительной лежкостью плодов по аллелям гена биосинтеза экспансина *MD-Exp7*, проведенная с использованием маркера *MD-Exp7^{SSR}* (Costa et al., 2008), показала, что в геномах сортов Голден Делишес, Голден Спур, Хани крисп, Памяти Нестерова, Лигол, Фуджи, Старк спур Голден Делишес, Имант, Редкрафт, Бреберн амплифицируется фрагмент размером 202 п. н., что предполагает наличие аллеля гена, детерминирующего средний уровень биосинтеза экспансина и, следовательно, среднюю степень потери твердости плодов. Фрагмент амплификации 198 п. н., свидетельствующий о наличии аллеля гена, детерминирующего сниженный уровень биосинтеза экспансина, идентифицирован у сортов Вымпел, Академик Казаков (Савельева, 2016).

Аллели размером 198 и 202 п. н., коррелирующие с минимальным уровнем синтеза экспансина, идентифицированы у формы 40-10 (Карповское × Шарлотта), которая характеризуется плотной мякотью и длительной лежкостью плодов. Однако такое сочетание аллелей 198/202 п. н. наблюдается не только у сортов с длительной лежкостью и плотной мякотью плодов, таких как Антей, Бабушкино, Банановое, Белорусское малиновое, но и у сортов Медуница, Мечта, Орловим, Новинка осени, Осеннее полосатое с плодами летнего и осеннего сроков созревания и рыхлой мякотью (Урбанович, 2013).

Следует отметить, что до настоящего времени крайне ограничены данные по изучению генетики адаптивно значимых и других ценных в хозяйственном отношении признаков.

Путем моделирования повреждающих факторов зимнего периода установлено, что высокие уровни зимостойкости наследуются в потомстве по типу количественных признаков и передаются определенной части семян. На формирование признака устойчивости яблони к низким температурам преобладающее влияние оказывают неаддитивные генные взаимодействия, однако на проявление признака устойчивости гибридных семян к резким перепадам температуры после оттепелей влияние неаддитивного действия генов выражено менее значительно (Савельев, 1998).

При преобладающем влиянии неаддитивного действия генов (доминирование, эпистаз, сверхдоминирование) на зимостойкость наиболее важное значение для селекции имеют определенные комбинации скрещивания с высокой специфической комбинационной способностью, в том числе и для отбора трансгрессивных генотипов, сочетающих на высоком уровне все компоненты зимостойкости, и превосходящие по устойчивости существующие аналоги. Доля таких семян в различных комбинациях незна-

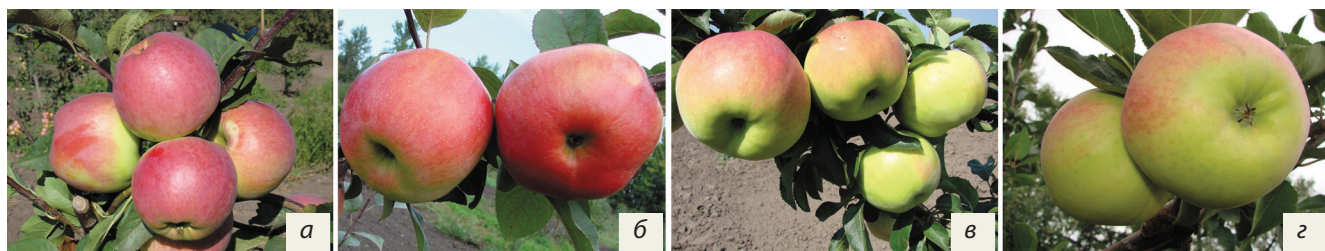


Рис. 1. Сорта яблони с моногенной устойчивостью к парше: а – Былина, б – Вымпел, в – Флагман, з – Фрегат.

чительна и составляет 1,3–12 %. Выделение из гибридных популяций трансгрессивных генотипов с выдающейся устойчивостью является одним из путей повышения уровня устойчивости геноплазмы плодовых культур к низким температурам (Савельева, 2016).

На основе генетико-селекционных исследований яблони, проведенных в Мичуринском отделении ВОГиС, в Госреестр селекционных достижений внесено 35 сортов. Для промышленного возделывания особого внимания заслуживают зимостойкие сорта зимнего срока потребления с моногенной устойчивостью к парше за счет интрогрессии гена *Rvi6*: Былина, Вымпел, Флагман, Фрегат (рис. 1).

Груша (*Pyrus*)

Частная генетика груши отстает от уровня исследований по генетике других плодовых (яблоня, персик, абрикос) культур. У груши до настоящего времени удалось идентифицировать лишь около 20 генов, контролирующих преимущественно второстепенные признаки, такие как слепая леталь (ген *d*), городчатый край листа (ген *Cr*), стерильные пыльники (ген *Sx₁*) (Knight, 1963).

Изучен характер наследования ряда морфологических признаков у сортов Доктор Жюль Гюйо, Вильямс, Конференция и Деканка дю Комис. Установлено, что темно-зеленая окраска листьев доминирует над светло-зеленой и находится под контролем гена *G*. Наследование красной окраски летних побегов контролируется доминантным геном *R*, тогда как зеленая и светло-зеленая – рецессивным геном *r*. Доминантным признаком также являются опушение летних побегов груши (ген *H*) и отсутствие железок на главной листовой жилке (ген *E*) (Knight, 1963).

К настоящему времени у груши сорта Bartlett (Вильямс) секвенировано 43419 предполагаемых генов (Chagne et al., 2014). Идентифицирован ген *Rvp1*, контролирующий устойчивость к парше (*Venturia pyrina* Aderh.), носителем которого является сорт груши «Navaga», и выявлен SSR-маркер SN02b10, тесно сцепленный с данным локусом (Bouvier et al., 2012). Использование в гибридизации груши уссурийской (*Pyrus ussuriensis* Max.) и ее производных, которая характеризуется устойчивостью к парше, является перспективным в создании новых устойчивых сортов (Мичурин, 1948; Яковлев, 1992). Донорами устойчивости к этому заболеванию могут служить сорта Августовская роса, Тема, Нежность, Осенняя мечта, Памяти Яковлева, в потомствах которых наблюдается высокий процент (67,1–100 %) устойчивых семян (Яковлев, 1992).

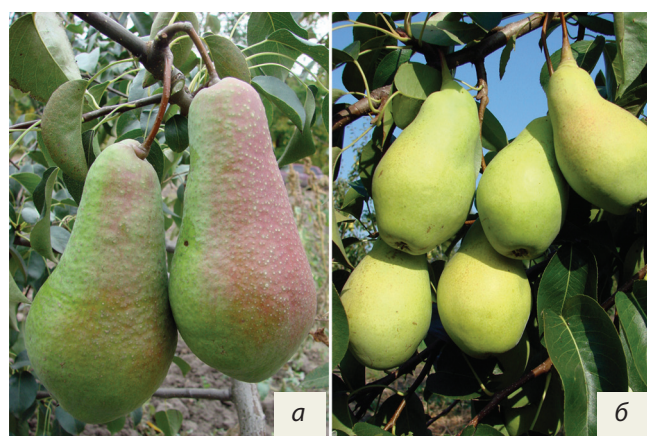


Рис. 2. Сорта груши с комплексной устойчивостью к болезням: а – Яковлевская, б – Феерия.

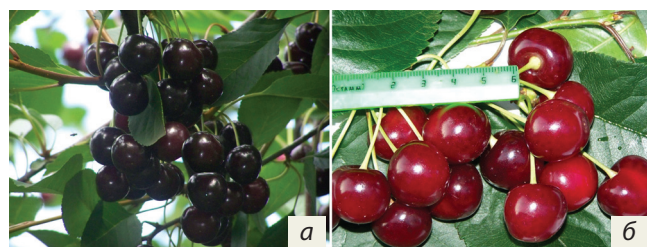


Рис. 3. Сорта вишни с высокой устойчивостью к коккомикозу: а – Харитоновская; б – Вечерняя заря.

Одно из приоритетных направлений в селекции груши – создание сортов, обладающих сдержанным ростом и компактной кроной. Перспективной исходной формой в селекции на слаборослость и компактность является форма груши Nain Vert, карликовость у которой контролирует главный ген *D* (Decourtye, 1967). Доминантный ген в гетерозиготном состоянии контролирует карликовость у сорта груши Обильная (Туз, Яковлев, 1983). С. Wang с коллегами (2011) был картирован генетический фактор (*PcDw*), контролирующий признак карликовости, и определены молекулярные SCAR- и SSR-маркеры, косегрегирующие с данным геном.

Ученые Мичуринского отделения ВОГиС проводят исследования по созданию зимостойких сортов груши

с моногенно детерминированной карликовостью. В качестве доноров карликовости используют формы груши Г-0, Г-1, Г-4, Р-2, Р-3, генетически связанные с формой Nain Vert, которые скрещиваются с зимостойкими сортами Северянка, Нежность, Памяти Яковлева. Скрининг гибридных семян на устойчивость к низким температурам проводится методом искусственного промораживания в середине зимовки при -37°C . В комбинации скрещивания (Нежность \times Г-0) было отобрано около 8 % семян с незначительным подмерзанием тканей (до 1 балла), причем из них 30 % генотипов были с генетически детерминированной карликовостью. Характер взаимодействия генов, контролирующих устойчивость к низким температурам у исходных форм груши, неодинаков. В различных комбинациях скрещивания, при некотором преимуществе аддитивных генных эффектов, роль эпистаза и доминирования также весьма значительна (Яковлев, 1992). Аналогичные исследования проводятся и в других научных учреждениях России, но пока еще не созданы коммерческие сорта груши с детерминированной карликовостью (Качалкин, 2011).

Одним из важнейших признаков сорта является качество плодов, которое оценивается по внешнему виду, вкусовым достоинствам и другим признакам. Красная покровная окраска плодов у сорта груши Вильямс красный контролируется доминантным геном *C*. На степень проявления окраски плодов способны влиять как модификационные взаимодействия генов, так и погодные условия. Сеянцы с окрашенными плодами могут выщепляться и в потомствах неокрашенных родительских форм, что предпологает наличие доминантного эпистаза, и структура генотипов таких неокрашенных исходных форм соответствует типу *Cc Dd*. При этом *D* подавляет действие гетерозиготы *Cc*, которая определяет покровную окраску плодов (Яковлев, 1992). Для скрининга генотипов груши с окрашенными плодами на ранних этапах зарубежными исследователями были разработаны SSR-маркеры MS06g03, CH5A03, CH05C07 (Booi et al., 2005; Pierantoni et al., 2010).

Среди факторов, ограничивающих возможности выведения высококачественных сортов груши, выступает, в первую очередь, терпкость плодов. Терпкость плодов груши контролирует ген *Ta*, а сочность – *Su* (Яковлев, 1992). Груша уссурийская (*P. ussuriensis*) и некоторые ее производные (Коперечки мичуринские) гомозиготны по доминантному аллелю *Su*. Структура генотипа сортов Тема, Поля, Бере Арданпон, Бере Боск, Бере Лигеля, Любимица Клаппа, Оливье де Серр и других соответствует *Susu*, а груши Финляндская желтая – *susu* (Яковлев, 1992). Груша уссурийская по наличию в плодах танинов, определяющих их терпкость, гомозиготна по гену *Ta*, а ее производные и культурные сорта (Тема, Ольга, Темнум, Бере Арданпон, Бере Клержо, Бере Лигеля, Деканка зимняя, Деканка осенняя, Жозефина Мехельнская и Оливье де Серр) – гетерозиготны (Яковлев, 1992).

У многих сортов груши в процессе созревания плодов происходит разложение танинов и выделение этилена. К настоящему времени идентифицированы молекулярные маркеры *Pc-ACS1a*, *Pc-ACS1b*, *Pc-ACS2a*, *Pc-ACS2b*, сцепленные с генами *Pc-ACS1*, *Pc-ACS2* и *Pc-AC01*,

контролирующими интенсивность биосинтеза этилена и экспансина – ген *Md-Exp7* (маркер *Md-Exp7^{SSR}*) в плодах, и определяющие их длительную лежкость и твердость мякоти (El-Sharkawy et al., 2004; Gao et al., 2007; Costa et al., 2008).

С использованием в гибридизации доноров длительной лежкости плодов (Дочь Зари, Поздняя МОСВИР, Бере зимняя Мичурина и др.) учеными Мичуринского отделения ВОГиС были созданы новые высокопродуктивные зимостойкие с комплексной устойчивостью к болезням, с длительной лежкостью (6–8 мес.) и высоким качеством плодов сорта: Гера, Февральский сувенир, Первомайская, Чудесница, Феерия, Яковлевская (рис. 2). Всего в Госреестр селекционных достижений внесено более 20 сортов, что составляет более 16 % от всего районированного сортимента этой культуры в России.

Вишня (*Prunus*)

Частная генетика вишни, так же как и у груши, изучена недостаточно, и к настоящему времени идентифицировано менее 20 генов, причем многие из них контролируют второстепенные признаки (Knight, 1969). Так, идентифицированы рецессивные гены, контролирующие морщинистость (*cc*) и пестролистность (*rg₁*) листьев. Самонесовместимость вишни, как и у многих других плодовых культур, определяется действием множественных аллеломорфов *S* (*S¹... S^h*). Выявлены маркеры, тесно сцепленные с локусами *SGB₁... SGB₆*, определяющими самонесовместимость (Ikeda et al., 2005). Темная покровная окраска плодов вишни является доминантной по отношению к красной, розовой и светлой и контролируется геном *R₁*. Генетическими источниками этого признака являются сорта Гриот Победа, Теньковская ранняя, Темноокрашенная, Россошанская темная, Харитоновская и другие (Жуков, Харитонова, 1988). Доминантными признаками также являются твердая (ген *Fm*) и темная (ген *R₂*) мякоть плодов вишни. Генетика большинства селекционно значимых признаков изучена недостаточно.

Значительный ущерб насаждениям вишни причиняет коккомикоз, вызываемый грибом *Coccomyces hiemalis* Nigg. Во ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина впервые идентифицирован доминантный ген *A*, контролирующий устойчивость к этому заболеванию, и выделен донор моногенной устойчивости Алмаз (Падочерус М \times Новоселка) \times Памяти Вавилова с гетерозиготным генотипом *Aa* по гену устойчивости (Жуков, Харитонова, 1988). В результате гибридизации сорта Жуковская с донором моногенной устойчивости к коккомикозу Алмаз получены высокопродуктивные устойчивые к коккомикозу сорта Харитоновская и Фея с плодами универсального назначения, которые включены в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Всего Мичуринским отделением ВОГиС создано восемь новых сортов вишни, из которых наибольшей экономической эффективностью характеризуются Харитоновская и Вечерняя зря (рис. 3).

У вишни высокий уровень толерантности к низким температурам может контролироваться блоками генов и передаваться потомству при межвидовых скрещиваниях. При скрещивании Падочеруса М (производного черемухи

японской *Padus Maacki* Rupr., Kom.), выдерживающего понижение температуры до -45°C , с вишней Памяти Вавилова (с потенциалом морозостойкости в -37°C) в потомстве выщеплялось около 50 % сеянцев с потенциалом морозостойкости, что соответствует расщеплению 1:1, характерному для моногенного наследования (Жуков, Харитоновна, 1988).

Создание сортов вишни со сдержанным ростом и компактной кроной – одно из приоритетных направлений селекции. На основе генетических исследований были отобраны исходные формы вишни, несущие в своем генотипе ген (O_2), контролирующей сдержанный рост и компактность кроны, – Багряная, Октава, Стандарт Урала, Ожерелье и др. (Жуков, Харитоновна, 1988).

В последние годы у вишни были идентифицированы экспансин-гены *PcEXP1...PcEXP5*, контролирующие созревание и размягчение кожицы плодов, а также выявлены маркеры, тесно сцепленные с аллелями этих генов (Karaaslan, Hrazdina, 2010).

Таким образом, с целью повышения экономической эффективности садоводства происходит постоянное совершенствование сортового состава яблони, груши и вишни. Для ускорения получения новых сортов разработаны десятки диагностических ДНК-маркеров к генам, определяющим устойчивость к болезням, продолжительность хранения плодов и другие селекционно значимые признаки. В результате исследований, проведенных в Мичуринском отделении ВОГиС, в Государственный реестр селекционных достижений включены сорта: яблони – 35, груши – 20, вишни – 8.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Жуков О.С., Харитоновна Е.Н. Селекция вишни. ВАСХНИЛ. М.: Агропромиздат, 1988.

Качалкин М.В. Колонны, которые плодоносят. М., 2011.

Кичина В.В. Колонновидные яблони. М.: ВСТИСП, 2006.

Мичурин И.В. Сочинения. I–IV. М., 1948.

Савельев Н.И. Генетические основы селекции яблони. Мичуринск, 1998.

Савельева Н.Н. Биологические и генетические особенности яблони и селекция иммунных к парше и колонновидных сортов. Мичуринск-наукоград РФ, 2016.

Савельева Н.Н., Савельева И.Н. Яблоня колонновидная (биология, генетика, селекция). Мичуринск-наукоград РФ, 2012.

Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони. Орел, 2011.

Туз А.С., Яковлев С.П. Груша. Достижения селекции плодовых культур и винограда. М., 1983:53-71.

Ульяновская Е.В. Новые методологические подходы к созданию иммунных высокоустойчивых к парше сортов яблони. Агро XXI. 2011;1-3:16-18.

Урбанович О.Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши. Минск: Право и экономика, 2013.

Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(4):757-767.

Яковлев С.П. Селекция и новые сорта груши. М.: Колос, 1992.

Afunian M.R., Goodwin P.N., Hunter D.M. Linkage of Vf4 in *Malus domestica* and *Malus floribunda* with Vf resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. Plant Pathol. 2004;53:461-467.

Alston F.N., Phillips K.L., Evans K.M. A *Malus* gene list. Proc. Eucarpia Symp. on Fruit Breed. and Genetics. Acta Hort. 2000;2(538): 561-565.

Alston F.H., Watkins R. Apple breeding at East Malling. Proc. Eucarpia Symp. on Tree Fruit Breeding. Canterbury, 1975:14-29.

Bai T. Fine genetic mapping of the Co locus controlling columnar growth habit in apple. Mol. Genet. Genomics. 2012;287:437-450.

Baldi P., Wolters P.J., Komjanc M., Viola R., Velasco R., Salvi S. Genetic and physical characterization of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Mol. Breeding. 2013; 31(2):429-440.

Beckmann J.S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica. 1986; 35:111-124.

Booi M.M., van Dyk M.G., du Preez D.J.G. Rees molecular typing of red and green phenotypes of “Bon Rouge” pear trees, with the use of microsatellites. Acta Hort., 2005;671:293-297.

Bouvier L., Bourcy M., Boulay M., Tellier M., Guerif P., Denance C., Durel C.-E., Lespinasse Y. A new pear scab resistance gene *Ryp1* from the European pear cultivar “Navara” maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2. Tree Genet. Genomes. 2012;8:53-60. DOI10.1007/s11295-011-0419-x.

Brown A.G., Harvey D.M. The nature and inheritance of sweetness and acidity in the cultivated. Euphytica. 1971;20(1):68-80.

Bus V.G.M., Rikkerink E.H., Aldwinckle H.S., Caffier V., Durel C.E., Gardiner S., Gessler C., Groenwold R., Laurens F., Le Cam B. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races. Acta Hort. 2009;814:739-746.

Bus V.G.M., Rikkerink E.H.A., Caffier V., Durel C.E., Plummer K.M. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. Ann Rev. Phytopathol. 2011;49:191-193.

Cevik V., King G.I. High-resolution genetic analysis of the Sd-1 aphid resistance locus in *Malus SSP*. Theor. Appl. Genet. 2002;105:346-354.

Chagne D., Crowhurst R.N., Pindo M., Thrimawithana A., Deng C., Ireland H., Fiers M., Dzierzon H., Cestaro A., Fontana P. The draft genome sequence of European pear (*Pyrus communis* L. “Bartlett”). PLoS ONE. 2014;9(4).

Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinell M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACSI* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). Euphytica. 2005;141:181-190.

Costa F., Van de Weg W.E., Stella S. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). Tree Genet. Genomes. 2008;4:575-586.

Dayton D.F., Williams E.B. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 1968;92:89-94.

Decourtye L. Etude de quelques caractères à contrôle génétique simple chez le pommier (*Malus* sp.) et le Poirier (*Pyrus communis*). Ann. Amel. Plantes. 1967;17:243-266.

El-Sharkawy I., Jones B., Gentzittel L., Leliavre J.-M., Pech J.C., Latche A. Differential regulation of ACC synthase genes in cold-dependent and -independent ripening in pear fruit. Plant Cell Environ. 2004;27:1197-1210.

Evans K.M., James C.M. Identification of SCAR markers linked to *Pl-w* moldew resistance in apple. Theor. Appl. Genet. 2003;106: 178-1183.

Gao M., Matsuta N., Murayama H., Toyomasu T., Mitsuhashi W., Dandekar A., Tao R., Nishimura K. Gene expression and ethylene production in transgenic pear (*Pyrus communis* cv. “La France”) with sense or antisense cDNA encoding ACC oxidase. Plant Sci. 2007; 173:32-42. DOI 10/1016/j.plantsci.2007.03.014.

Gessler C., Patocchi A., Kellerhals M., Gianfranceschi L. Molecular marker applied to apple breeding and map-based cloning of resistance genes. IOBC/WPRS Bull. 1997;20:105-109.

Gessler C., Pertot I. Vf scab resistance of *Malus*. Trees-Struct. Funct. 2012;26(1):95-108.

- Ikedo K., Ushijima K., Yamane H., Tao R., Hauck N.R., Sebolt A.M., Iezzoni A. Linkage and physical distances between the S-haplotype S-RNase and SFB genes in sweet cherry. *Sex. Plant Reprod.* 2005;17(6):289-296.
- Jacob H.B. Breeding experiments of apple varieties with columnar growth and low chilling requirements. *Acta Hort.* 2010:159-164.
- Karaaslan M., Hrazdina G. Characterization of an expansin gene and its ripening-specific promoter fragments from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivars. *Acta Physiol. Plant.* 2010;32:1073-1084. DOI 10/1007/s11738-010-0499-5.
- Knee M., Hatfield S.G.S. Benefits of ethylene removal during apple storage. *Ann. Appl. Biol.* 1981;98:157-165.
- Knigt R.L. Abstract bibliography of fruit breeding and genetics to 1960. *Malus and Pyrus. Tech. Commun. Bur. Hort. Plant Crops, E. Malling.* London, 1963.
- Knight R.L. Abstract bibliography of fruit breeding and genetics to 1965. *Prunus.* London: Eastern Press, 1969.
- Maliepaard C., Alston F.H., Van Arkel G., Brown L.M., Chevreau E., Dunemann F., Evans K.M., Gardiner S., Guilford P., Van Heusden A.W., Janse J., Laurens F., Lynn J.R., Manganaris A.G., Den Nijs A.P.M., Periam N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J.J., Vrielink-Van Ginkel M., King G.L. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumilla* Mill.) using multiallelic markers. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:60-73.
- Moriya S., Okada K., Haji T., Yamamoto T., Abe K. Fine mapping of *Co*, a gene controlling columnar growth habit located on apple (*Malus × domestica* Borkh.) linkage group 10. *Plant Breeding.* 2012;131(5): 641-647.
- Patocchi A., Walser M., Tartarini S., Broggin G., Gennari F., Sansavini S., Gessler C. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated to the apple scab resistance gene *V_m*. *Genome.* 2005;48:639-636.
- Patrascu B., Pamfil D., Sestras R., Botez C., Gaboreanu I., Bărbos A., Qin C., Rusu R., Bondrea I., Dîrle E. Marker assisted selection for response attack of *Venturia inaequalis* in different apple genotypes. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 2006;34:121-132.
- Patzak J., Paprstein F., Hencychova A. Identification of apple scab and powdery mildew resistance genes in Czech apple (*Malus × domestica*) genetic resources by PCR molecular markers. *Czech. J. Genet. Plant Breed.* 2011;47:156-165.
- Pierantoni L., Dondinia L., De Franceshia P., Musacchi S., Winkel B.S.J., Sansavini S. Mapping of an anthocyanin-regulating MYB transcription factor and its expression in red and green pear, *Prunus communis*. *Plant Physiol. Bioch.* 2010;48:1020-1026. DOI 10.1016/j.plaphy/2010/09/002.
- Sampson D.R., Cameron D.F. Inheritance of bronze foliage, extra petals and pendulous habit in ornamental crabapples. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1965;86:717-722.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 1999;119:1297-1304.
- Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S. Development of reliable PCR markers for the selection of the *V_f* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding.* 1999;118:183-186.
- Tartarini S., Sansavini S., Vinatzer B., Gennari F., Domizi C. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *V_f* scab resistance gene. *Acta Hort.* 2000;538:549-552.
- Tobutt K.P. Breeding columnar apple varieties at East Malling. *Acta Hort.* 1985;159:63-68.
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S.K., Troggio M., Pruss D., Salvi S., Pindo M., Baldi P., Castelletti S., Cavaiuolo M., Coppola G., Costa F., Cova V., Dal Ri A., Goremykin V., Komjanc M., Longhi S., Magnago P., Malacarne G., Malnoy M., Micheletti D., Moretto M., Perazzolli M., Si-Ammour A., Vezzulli S., Zini E., Ehdredge G., Fitzgerald L.M., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J.T., Reid J., Wardell B., Kodira C., Chen Z., Desany B., Niaz F., Palmer M., Koepke T., Jiwan D., Schaeffer S., Krishnan V., Wu C., Chu V.T., King S.T., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchiatti A., Kater M.M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A.C., Bus V., Chagné D., Crowhurst R.N., Gleave A.P., Lavezzo E., Fawcett J.A., Proost S., Rouzé P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R.P., Durel C.E., Gutin A., Bumgarner R.E., Gardiner S.E., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Nat. Genet.* 2010; 42(10):833-839.
- Vinatzer B., Patocchi A., Gianfranceschi L., Tartarini S., Zhang H.B., Gessler C., Sansavini S. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *V_f* apple scab resistance. *Mol. Plant-Microbe In.* 2001;14:508-515.
- Wang C., Tian Y., Buck E.J., Gardiner S.E., Dai H., Jia Y. Genetic mapping of PcDw determining pear dwarf trait. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2011;136(1):48-53.
- Wolters P.J., Schouten H.J., Velasco R., Si-Ammour A., Baldi P. Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase. *New Phytol.* 2013;200:993-999.
- Xu Y., Crouch J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Sci.* March-April. 2008;48: 391-407.