

Научный рецензируемый журнал

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

## Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

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

## Ответственный секретарь

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

## Редакционный совет

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

## Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

## Founders

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

## Editor-in-Chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

## Executive Secretary

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

## Editorial council

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

## Editorial board

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

633

ОТ РЕДАКТОРА

## Генетика растений

634

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

SSR-анализ геномной ДНК перспективных сортов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции

А.Т. Адылова, Ж.К. Норбеков, Э.Э. Хуршут, Е.В. Никитина, Ф.Н. Кушанов

640

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы

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

648

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Анализ полиморфизма генома представителей синтетического вида  $\times$ *Tritictrigia cziczinii* Tsvet. методом AFLP

А.А. Трифонова, К.В. Борис, Л.В. Дедова, В.А. Мельник, Л.П. Иванова, Н.П. Кузьмина, С.В. Завгородний, В.П. Упелниек

654

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Оценка генетического разнообразия некоторых сибирских и дальневосточных видов рода *Spiraea* (Rosaceae) на основе разработанных мультиплексных панелей из ядерных микросателлитных локусов

Т.А. Полякова, А.В. Шатохина, Г.Н. Бондаренко, Д.В. Политов

660

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Полиморфизм генов биосинтеза этилена и экспансина у местных и стародавних сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) из коллекции генетических ресурсов растений ВИР

И.Н. Шамшин, А.В. Шлявас, А.А. Трифонова, К.В. Борис, А.М. Кудрявцев

667

ОБЗОР

Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии

Т.И. Одинцова, М.П. Слезина, Е.А. Истомина

## Селекция растений на иммунитет и продуктивность

676

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России

И.Ф. Лапочкина, О.А. Баранова, Н.Р. Гайнуллин, Г.В. Волкова, Е.В. Гладкова, Е.О. Ковалева, А.В. Осипова

685

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна

Т.Ю. Гагкаева, А.С. Орина, О.П. Гаврилова, И.Б. Аблова, Л.А. Беспалова

693

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Последовательности, гомологичные участкам гена *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, у сортов картофеля, созданных методами традиционной селекции

О.Ю. Антонова, Н.С. Клименко, З.З. Евдокимова, Л.И. Костина, Т.А. Гавриленко

703

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ДНК-диагностика гена *RPV3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью

Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина, С.В. Токмаков, Л.Г. Наумова

708

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние погодных-климатических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе

Л.Ю. Новикова, И.В. Сеферова, А.Ю. Некрасов, И.Н. Перчук, Т.В. Шеленга, М.Г. Самсонова, М.А. Вишнякова

## Генетика человека

- 716 **ОБЗОР**  
Современные представления  
о генетике агрессивного поведения  
*Ю.Д. Давыдова, С.С. Литвинов, Р.Ф. Еникеева,  
С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова*
- 726 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Анализ мутаций в генах  
*CDC27, STBP2, HYDIN и KMT5A*  
при каротидных параганглиомах  
*Е.Н. Лукьянова, А.В. Снежкина, Д.В. Калинин,  
А.В. Покровский, А.Л. Головюк, О.А. Степанов,  
Е.А. Пудова, Г.С. Размахеев, М.В. Орлова,  
А.П. Поляков, М.В. Киселева, А.Д. Каприн,  
А.В. Кудрявцева*

## Генетика животных

- 734 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Генетическая изменчивость  
бурятской и алтайской пород  
крупного рогатого скота, оцененная  
на основе анализа полиморфизма  
генов *GH1, GHR* и *PRL*  
*И.В. Лазебная, А.В. Перчун, Б.Б. Лхасаранов,  
О.Е. Лазебный, Ю.А. Столповский*
- 742 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Оценка современного состояния  
генофонда холмогорской  
и черно-пестрой пород  
крупного рогатого скота на основе  
полногеномного SNP-анализа  
*А.В. Доцев, А.А. Сермягин, А.В. Шахин, И.А. Паронян,  
К.В. Племяшов, Х. Рейер, К. Виммерс, Г. Брем,  
Н.А. Зиновьева*

633

ОТ РЕДАКТОРА

## Plant genetics

634

ORIGINAL ARTICLE

SSR analysis of the genomic DNA of perspective Uzbek hexaploid winter wheat varieties

A.T. Adylova, G.K. Norbekov, E.E. Khurshut, E.V. Nikitina, F.N. Kushanov

640

ORIGINAL ARTICLE

SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm

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

648

ORIGINAL ARTICLE

Genome polymorphism of the synthetic species  $\times$  *Tritictrigia cziczinii* Tsvet. inferred from AFLP analysis

A.A. Trifonova, K.V. Boris, L.V. Dedova, V.A. Melnik, L.P. Ivanova, N.P. Kuzmina, S.V. Zavgorodny, V.P. Upelnik

654

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) by newly developed multiplex panels of nuclear SSR loci

T.A. Poliakova, A.V. Shatokhina, G.N. Bondarenko, D.V. Politov

660

ORIGINAL ARTICLE

Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources

I.N. Shamshin, A.V. Shlyavas, A.A. Trifonova, K.V. Boris, A.M. Kudryavtsev

667

REVIEW

Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology

T.I. Odintsova, M.P. Slezina, E.A. Istomina

## Plant breeding for immunity and performance

676

ORIGINAL ARTICLE

The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia

I.F. Lapochkina, O.A. Baranova, N.R. Gainullin, G.V. Volkova, E.V. Gladkova, E.O. Kovaleva, A.V. Osipova

685

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of resistance of winter wheat varieties to Fusarium head blight

T.Yu. Gagkaeva, A.S. Orina, O.P. Gavrilova, I.B. Ablova, L.A. Bespalova

693

ORIGINAL ARTICLE

Finding *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*-like sequences in conventionally bred potato varieties

O.Y. Antonova, N.S. Klimenko, Z.Z. Evdokimova, L.I. Kostina, T.A. Gavrilenko

703

ORIGINAL ARTICLE

DNA-marker based identification of the *RPV3* gene determining downy mildew resistance in grapevines

E.T. Ilnitskaya, M.V. Makarkina, S.V. Tokmakov, L.G. Naumova

708

ORIGINAL ARTICLE

Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus

L.Yu. Novikova, I.V. Seferova, A.Yu. Nekrasov, I.N. Perchuk, T.V. Shelenga, M.G. Samsonova, M.A. Vishnyakova

## Human genetics

- 716 **REVIEW**  
Recent advances in genetics  
of aggressive behavior  
*J.D. Davydova, S.S. Litvinov, R.F. Enikeeva, S.B. Malykh,  
E.K. Khusnutdinova*
- 726 **ORIGINAL ARTICLE**  
Analysis of mutations in *CDC27*,  
*CTBP2*, *HYDIN* and *KMT5A* genes  
in carotid paragangliomas  
*E.N. Lukyanova, A.V. Snezhkina, D.V. Kalinin,  
A.V. Pokrovsky, A.L. Golovyuk, O.A. Stepanov,  
E.A. Pudova, G.S. Razmakhaev, M.V. Orlova,  
A.P. Polyakov, M.V. Kiseleva, A.D. Kaprin,  
A.V. Kudryavtseva*

## Animal genetics

- 734 **ORIGINAL ARTICLE**  
Analysis of *GH1*, *GHR* and *PRL*  
gene polymorphisms for estimation  
of the genetic diversity of Buryat  
and Altai cattle breeds  
*I.V. Lazebnaya, A.V. Perchun, B.B. Lhasaranov,  
O.E. Lazebny, Yu.A. Stolpovskiy*
- 742 **ORIGINAL ARTICLE**  
Evaluation of current gene pool  
of Kholmogor and Black-and-white  
cattle breeds based on whole genome  
SNP analysis  
*A.V. Dotsev, A.A. Sermyagin, A.V. Shakhin, I.A. Paronyan,  
K.V. Plemyashov, H. Reyer, K. Wimmers, G. Brem,  
N.A. Zinovieva*

Уважаемые коллеги, дорогие читатели!  
Предлагаем Вашему вниманию очередной выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции».

В традиционный раздел «Генетика растений» вошли пять оригинальных исследований и одна обзорная статья, в которой обсуждаются тионины растений, входящие в семейство антимикробных пептидов и являющиеся одним из важнейших компонентов защитной системы растений. Три экспериментальные статьи посвящены применению в генетических и селекционных исследованиях у растений SSR-маркеров, разработанных к микросателлитным локусам. По результатам изучения сортов мягкой пшеницы узбекистанской селекции с помощью SSR-праймеров были разработаны генетические формулы, которые могут использоваться в селекционных программах для подбора родительских пар. В задачи другого исследования входила оценка эффективности микросателлитных маркеров для идентификации образцов кукурузы, характеризующихся восковидной структурой эндосперма. Уникальные сочетания аллелей микросателлитных локусов оптимальны для маркер-ассоциированного отбора образцов кукурузы с высоким накоплением амилопектина. Для оценки генетической структуры и изменчивости растений близкородственных видов *Spiraea* ssp. из природных популяций Дальнего Востока и Сибири разработаны мультиплексные панели к нескольким микросателлитным локусам. Показано, что генетическая дифференциация, основанная на частотах аллелей SSR-локусов, соответствует географическому положению образцов. Метод маркирования с помощью маркеров другого типа – AFLP – был использован для изучения генетического разнообразия синтетического вида *Triticum turgidum*, полученного в результате гибридизации различных видов пшеницы и пырея. В последней экспериментальной статье данного раздела проанализировано аллельное разнообразие генов биосинтеза этилена и экспансина, вовлеченных в контроль лежкости плодов у местных и стародавних сортов яблони из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). С помощью молекулярных маркеров различного типа в местных и стародавних сортах выявлены редкие аллели данных генов, что может быть полезно при оценке селекционного потенциала сортов яблони.

Рубрика «Селекция растений на иммунитет и продуктивность» состоит из пяти экспери-

ментальных работ, в которых представлены результаты создания и изучения культурных растений с помощью классических методов селекции и с привлечением современных биотехнологических подходов. Так, в одной из работ рассмотрены полученные устойчивые линии озимой пшеницы, содержащие несколько генов устойчивости к стеблевой ржавчине и комплекс хозяйственно ценных признаков. В другом исследовании проведен молекулярный скрининг коллекции сортов картофеля отечественной и зарубежной селекции ген-специфическими маркерами, ассоциированными с устойчивостью к фитофторозу и мужской стерильностью. Методы молекулярного маркирования были использованы для идентификации в коллекции сортов винограда гена устойчивости к милдью – наиболее вредоносному грибному заболеванию этой культуры. Полученные результаты соотнесены с уровнем устойчивости сортов винограда и с их родословной. С помощью биоинформатических подходов проведен анализ результатов более чем тридцатилетней оценки содержания белка и масла в образцах сои из коллекции ВИР. Методом регрессионного анализа построены модели зависимости содержания параметров белка и масла от погодно-климатических условий на Северном Кавказе.

Следующий раздел «Генетика человека» включает две публикации. В обзорной статье рассматриваются генетические механизмы нормального и агрессивного (патологического) поведения человека. Экспериментальные данные, основанные на полногеномном анализе ассоциаций, позволили выявить гены-кандидаты развития агрессивного поведения, среди которых наиболее вероятными являются гены серотонинергической и дофаминергической систем, а также гены ферментов их метаболизма. Во второй статье представлены результаты изучения молекулярного патогенеза и анализ генов-кандидатов развития каратиноидной параганглиомы.

Последняя рубрика журнала содержит две оригинальные работы в области генетики животных, посвященные изучению широко распространенных и уникальных пород крупного рогатого скота отечественного происхождения. Эксперименты выполнены с использованием современных методов молекулярного маркирования и ассоциативного картирования. В одной из работ на основе анализа целевых генов гормона роста, его рецептора и пролактина выявлены особенности внутривидовой изменчивости российского аборигенного алтайского крупного рогатого скота и представителей бурятской породы. В другой на основе анализа SNP-профилей установлены генетические различия между популяциями холмогорского и черно-пестрого скота с разной степенью кровности по голштинской породе.

Обращаем внимание наших читателей, что оригинальные статьи по истории генетики, анонсы и итоги конференций, обзорные и дискуссионные статьи можно опубликовать в электронном издании «Письма в Вавиловский журнал» (<http://pismavavilov.ru/>). Рукописи принимаются по электронной почте: [vavilov\\_journal@bionet.nsc.ru](mailto:vavilov_journal@bionet.nsc.ru). Всем статьям присваивается индекс DOI.

# SSR-анализ геномной ДНК перспективных сортов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции

А.Т. Адылова, Ж.К. Норбеков, Э.Э. Хуршут, Е.В. Никитина, Ф.Н. Кушанов

Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

Целью работы было изучение генетического разнообразия сортов мягкой пшеницы узбекистанской селекции, так как они являются источником адаптированного к местным условиям обитания растительного материала и могут служить важнейшим поставщиком генетических ресурсов для селекционных работ по пшенице не только в Узбекистане, но и в других странах. В настоящее время микросателлитные маркеры (simple sequence repeats, SSR – простые повторяющиеся последовательности) – одни из наиболее широко используемых и эффективных классов ДНК-маркеров для генотипирования, паспортизации и классификации сортов растений. В работе представлены результаты генотипирования 32 сортов мягкой пшеницы отечественной селекции с использованием 144 микросателлитных праймерных пар, выбранных исходя из литературных данных, 36 пар из них дали полиморфные хорошо воспроизводимые ПЦР-фрагменты. Для каждого сорта были получены индивидуальные SSR-спектры, различающиеся числом ампликонов. По 36 микросателлитным локусам выявлен 141 аллель, их число на локус ( $N_a$ ) составляло от 2 до 6 (3 в среднем). Для изученной группы генотипов эффективное число аллелей ( $ne$ ), характеризующее локусы по частоте встречаемости аллелей, варьировало от 1.7 до 4.8, составляя в среднем 2.8. Величина ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) в нашей популяции пшеницы была в среднем 0.626, меняясь от 0 до 0.792. Размеры амплифицированных продуктов находились в пределах от 93 до 552 п. н. Индекс полиморфного информационного содержания ( $PIC$ ) варьировал от 0 до 0.758. На основании набора аллелей микросателлитных локусов была построена дендрограмма, отражающая филогенетические различия изученных сортов мягкой пшеницы, которая показала, что сорта узбекистанской селекции разделяются на два больших кластера, это свидетельствует о возможной общности их происхождения. Для каждого сорта пшеницы Узбекистана разработана генетическая формула, которая может быть использована для идентификации, паспортизации этих сортов, а также при подборе родительских пар в селекционных программах по пшенице.

Ключевые слова: мягкая озимая пшеница; ПЦР-анализ; генетическое разнообразие; микросателлитные локусы ДНК; кластеризация; паспортизация.

## SSR analysis of the genomic DNA of perspective Uzbek hexaploid winter wheat varieties

A.T. Adylova, G.K. Norbekov, E.E. Khurshut, E.V. Nikitina, F.N. Kushanov

Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

The objective of this study was to investigate the genetic diversity of hexaploid wheat varieties of Uzbekistan breeding using simple sequence repeat (SSR) markers. These varieties are adapted to local conditions, and can be considered as the most important supplier of genetic resources for cultivation in Uzbekistan and other countries. Microsatellite markers are now most widely used and effective classes of DNA markers for genotyping, certification and classification of plant varieties. In this paper, genotyping results of 32 hexaploid wheat domestic varieties using 144 microsatellite primer pairs are presented. Microsatellite primer pairs were chosen from literature data and 36 primer pairs (from 144) gave polymorphic well-reproducible PCR-fragments. The individual SSR spectra differing in number of amplicons were obtained for each variety. A total number of 141 alleles for 36 microsatellite loci were detected. The number of alleles per locus ranged from 2 to 6, the mean number of alleles per locus ( $N_a$ ) was 3 alleles. For the studied genotypes group the effective number of alleles ( $ne$ ) characterizing the loci by the allele frequency, varied from 1.7 to 4.8, the mean number of alleles per locus was 2.8. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged from 0 to 0.792, averaging 0.626, in studied wheat population. The amplified fragment sizes ranged from 93 to 552 bp. The polymorphic index content ( $PIC$ ) ranged from 0 to 0.758. A dendrogram was constructed using the alleles set of microsatellite loci, reflecting the phylogenetic differences of the studied hexaploid wheat varieties. It showed that Uzbekistan breeding varieties are divided into two main clusters, which may be evidence of their common origin. A genetic formula has been developed for each Uzbek wheat variety. It can be used for identification, certification of these varieties, as well as for the selection of parental pairs in the wheat breeding programs.

Key words: hexaploid winter wheat; PCR analysis; genetic diversity; microsatellite DNA loci; clusterization; barcoding.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Адылова А.Т., Норбеков Ж.К., Хуршут Э.Э., Никитина Е.В., Кушанов Ф.Н. SSR-анализ геномной ДНК перспективных сортов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):634-639. DOI 10.18699/VJ18.404

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Adylova A.T., Norbekov G.K., Khurshut E.E., Nikitina E.V., Kushanov F.N. SSR analysis of the genomic DNA of perspective Uzbek hexaploid winter wheat varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):634-639. DOI 10.18699/VJ18.404

С введением в практику биологических исследований ДНК-маркеров появились новые возможности изучения генетического разнообразия организмов (Гостимский и др., 2005). В частности, SSR или микросателлитный анализ генома многих растений показал, что микросателлитные локусы, представленные множественными аллелями и характеризующиеся сравнительно высокой гетерогенностью, – удобный инструмент для анализа полиморфизма геномной ДНК.

Метод анализа полиморфизма микросателлитных локусов позволяет получить воспроизводимые информативные профили известных фрагментов генома и поэтому наиболее перспективен для идентификации, паспортизации и сертификации сортов и гибридов культурных растений (Сулимова, 2004).

Пригодность маркера для указанных целей зависит от числа аллелей, которые имеет этот маркер, и их соответствующих относительных частот. Количественно степень полиморфизма обычно измеряется двумя различными величинами, или показателями: гетерозиготность ( $H$ ), для которой объективный алгоритм оценки и формула изменчивости хорошо известны (Nei, Roychoudhury, 1974; Nei, Li, 1979), и величина информационного полиморфизма ( $PIC$ ).

Гетерозиготность рассматривается как средняя порция локусов с двумя различными аллелями в одном локусе у одной особи. Этот показатель распространяется на всю популяцию или какую-то ее часть и подразделяется на наблюдаемую ( $H_o$ ) и ожидаемую ( $H_e$ ) гетерозиготность. Когда описывают генетическое разнообразие, обычно определяют ожидаемую гетерозиготность, поскольку она менее чувствительна к размеру выборки, чем наблюдаемая гетерозиготность (Чесноков, Артемьева, 2015).

Мера  $PIC$  определяется способностью маркера улавливать полиморфизм популяции в зависимости от числа обнаруживаемых аллелей и распределения их частот и тем самым эквивалентна генному разнообразию. Для доминантных маркеров максимальное значение  $PIC$  составляет 0.5. Значение  $PIC$  приближается к единице, если локус имеет множество аллелей с примерно равной частотой встречаемости, и равно нулю, если локус мономорфный (Чесноков, Артемьева, 2015). Еще один параметр, используемый для оценки генетической изменчивости, называется эффективным числом аллелей ( $ne$ ). Показатель  $ne$  связан с гетерозиготностью простой зависимостью:  $ne = 1/(1-H_e)$ , т. е. это величина, обратная доле гомозиготных локусов особи. Она представляет собой число аллелей, встречающихся в популяции с равной частотой и обеспечивающих заданную гетерозиготность при случайном скрещивании (Ayala, Kiger, 1984).

Цель настоящей работы – исследование генетической структуры мягкой пшеницы узбекистанской селекции с использованием перечисленных выше мер оценки генетического разнообразия. Изучение этого вопроса актуально, так как эти сорта являются источником адаптированного к местным условиям обитания растительного материала и могут служить важнейшим поставщиком генетических ресурсов для селекционных работ по пшенице не только в Узбекистане, но и в других странах.

## Материалы и методы

В работе было использовано 32 сорта мягкой пшеницы отечественной селекции, основная часть которых введена в реестр сельскохозяйственных культур Узбекистана: Turkiston; Kelajak; Barhayot; Chillaki; Pahlavon; Farovon; Hazrati Bashir; Bardosh; Bobur; Omad; Gozgon; Matonat; Sanzar 8; Elomon; Boysuntura; Andijon 2; Andijon 4; Dostlik; Yaksart; Muftalo; Asr; Durdona; Taraqqiyot; Kokbuloq; Bunyodkor; Hisorak; Jayhun; Uzbek; Oqmarvarid; Iftihor; Ustoz; Andijon 1.

Выделение ДНК, ее амплификацию, электрофорез и визуализацию продуктов амплификации проводили по стандартным методикам (Dellaporta et al., 1983). В работе использована 51 микросателлитная праймерная пара (из базы данных Grain Genes, <http://wheat.pw.usda.gov>), в том числе: 18 – из группы WMC (Röder et al., 1998), 12 – из группы BARC (Song et al., 2002), 10 – из группы WMS (Röder et al., 1998), 4 – из группы CFD (Guyomarc'h et al., 2002), 3 – из группы GPW (Sourdille et al., 2004), 2 – из группы CFA (Sourdille et al., 2004), а также по одной паре из коллекций PSP (Devos et al., 1995) и GDM (Zhao et al., 2006). При идентификации и определении размеров аллелей микросателлитных локусов использовали программы Gel-Pro Analyzer 3.1. Значение  $PIC$  для каждого маркера вычисляли при помощи собственного скрипта на языке R (R Core Team, 2016), успешно примененного нами ранее (Khurshut et al., 2017). Статистическую обработку результатов и построение диаграмм осуществляли с использованием среды R (R Core Team, 2016).

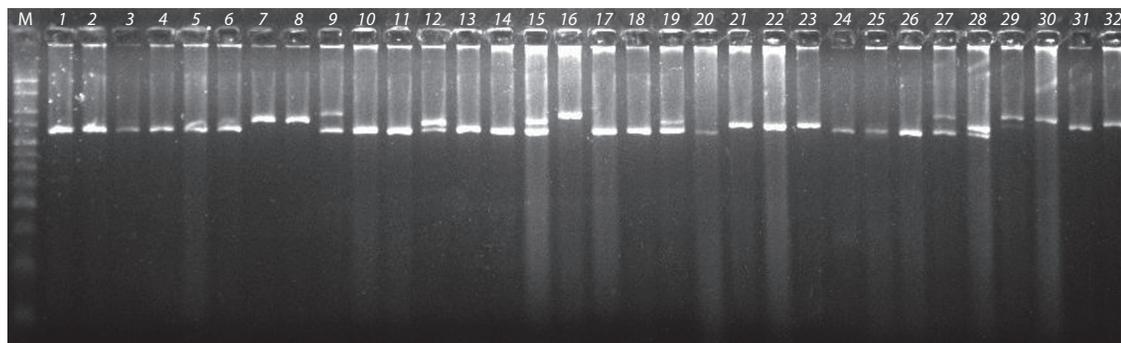
## Результаты и обсуждение

ДНК 32 генотипов мягкой пшеницы отечественной селекции были зондированы с помощью 144 микросателлитных праймерных пар, которые были отобраны нами как ожидаемо информативные маркеры, на основании анализа зарубежной литературы, а также собственных ранее проведенных исследований по генотипированию гермиплазмы гексаплоидной пшеницы отечественной селекции. Однако из 144 выбранных микросателлитных праймерных пар амплифицировалась лишь 51.

В результате SSR-анализа 32 генотипов пшеницы были получены специфические и хорошо воспроизводимые фрагменты ДНК. Для каждого сорта определены индивидуальные SSR-спектры, различающиеся числом ампликонов, их размерами и степенью выраженности на электрофореграммах (рис. 1).

По результатам скрининга из дальнейшего исследования были исключены малоинформативные локусы, у которых  $PIC < 0.3$ : BARC6, BARC96, BARC139, BARC159, BARC206, CFA2149, CFA2209, GPW3032, WMC177, WMC311, WMC356, WMC367, WMC727, WMS539, WMS577. Интересно, что праймерная пара CFD239 давала по одному ПЦР-продукту, что выявилось нулевым значением  $PIC$  (табл. 1). Однако она детектировалась у 28 из 32 сортов пшеницы, и мы оставили эту праймерную пару для дальнейших исследований. Таким образом, набор локусов был сужен до 36.

При исследовании по 36 микросателлитным локусам был выявлен 141 аллель. Их число на локус варьировало



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК мягкой пшеницы узбекистанской селекции с праймером PSP3000.

М – маркер ДНК; 1–32 – пробы ДНК изученных сортов (см. Материалы и методы).

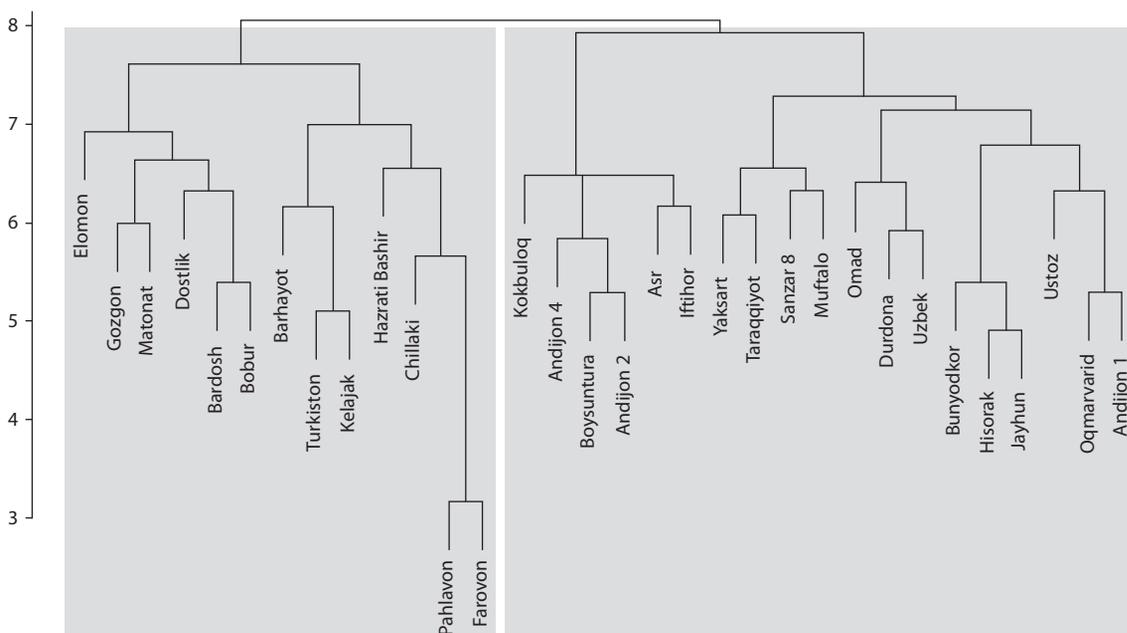
**Таблица 1.** Характеристика микросателлитных локусов ДНК

№ п/п	Название локуса	$N_a$	$PI_C$	$H_e$	Размер ампликона, п. н.	Эффективное число аллелей	Литературный источник
1	WMS349	5	0.758	0.792	131–152	4.8	Röder et al., 1998
2	WMC526	6	0.720	0.762	169–513	4.2	Somers et al., 2004
3	PSP3000	5	0.713	0.750	233–301	4.0	Devos et al., 1995
4	CFD76	6	0.694	0.737	155–260	3.8	Guyomarc'h et al., 2002
5	WMC626	4	0.681	0.732	212–271	3.7	Somers et al., 2004
6	WMC276	4	0.677	0.725	318–349	3.6	»
7	WMC445	4	0.666	0.717	251–283	3.5	»
8	GDM33	6	0.663	0.716	135–266	3.5	Zhao et al., 2006
9	WMC453	5	0.661	0.708	176–230	3.4	Somers et al., 2004
10	GPW2203	5	0.661	0.715	185–332	3.5	Sourdille et al., 2004
11	GPW2181	5	0.655	0.710	146–310	3.4	»
12	WMC216	4	0.639	0.695	93–146	3.2	Somers et al., 2004
13	BARC74	5	0.628	0.674	105–133	3.6	Lowe et al., 2011
14	WMC104	6	0.613	0.676	160–430	3.1	Somers et al., 2004
15	WMS513	4	0.605	0.668	127–164	3.0	Röder et al., 1998
16	WMC273	4	0.596	0.651	190–278	2.8	Somers et al., 2004
17	CFD23	3	0.585	0.659	253–283	2.9	Guyomarc'h et al., 2002
18	WMS630	3	0.581	0.655	173–203	2.8	Röder et al., 1998
19	WMS291	4	0.576	0.645	116–192	2.8	»
20	WMC198	3	0.576	0.651	210–283	2.8	Somers et al., 2004
21	WMC367	3	0.572	0.645	159–194	2.8	»
22	WMS495	3	0.567	0.641	134–166	2.7	Röder et al., 1998
23	BARC182	3	0.565	0.642	106–134	2.7	Somers et al., 2004
24	WMS512	3	0.562	0.639	195–204	2.7	Röder et al., 1998
25	WMC166	3	0.515	0.586	353–402	2.4	Somers et al., 2004
26	CFD267	3	0.504	0.589	263–313	2.4	Guyomarc'h et al., 2002
27	WMS443	5	0.499	0.580	127–237	2.3	Röder et al., 1998
28	BARC176	3	0.489	0.562	231–296	2.2	Somers et al., 2004
29	BARC175	3	0.477	0.569	224–246	2.3	»
30	WMC167	3	0.472	0.560	204–222	2.2	»
31	WMS295	5	0.467	0.550	232–552	2.2	Röder et al., 1998
32	BARC80	3	0.460	0.542	112–130	2.1	Somers et al., 2004
33	WMC432	4	0.456	0.498	197–257	1.9	»
34	BARC187	3	0.378	0.428	273–308	1.7	Lowe et al., 2011
35	BARC96	2	0.357	0.465	184–202	1.8	Song et al., 2002
36	CFD239	1	0.000	0.000	249	0.0	Guyomarc'h et al., 2002
Среднее		3	0.564	0.626		2.8	

**Таблица 2.** Формулы генотипов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции

Сорт	Формула
Hazrati Bashir	A <sub>5</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> B <sub>6</sub> C <sub>4</sub> D <sub>3</sub> D <sub>6</sub> E <sub>1</sub> F <sub>4</sub> G <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> H <sub>4</sub> I <sub>3</sub> I <sub>4</sub> J <sub>1</sub> J <sub>4</sub> K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> K <sub>4</sub> L <sub>2</sub> L <sub>4</sub> M <sub>3</sub> M <sub>4</sub> N <sub>1</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub>
Andijon 1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> B <sub>6</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub> D <sub>5</sub> E <sub>3</sub> F <sub>3</sub> G <sub>2</sub> H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> I <sub>1</sub> I <sub>2</sub> I <sub>3</sub> J <sub>2</sub> K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> K <sub>4</sub> L <sub>2</sub> L <sub>4</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>4</sub>
Dostlik	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> B <sub>6</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> D <sub>6</sub> E <sub>4</sub> F <sub>2</sub> G <sub>4</sub> H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> H <sub>4</sub> I <sub>2</sub> I <sub>3</sub> J <sub>1</sub> J <sub>3</sub> K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> K <sub>3</sub> L <sub>2</sub> L <sub>4</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> N <sub>2</sub> N <sub>3</sub> N <sub>5</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>4</sub>
Bobur	A <sub>5</sub> B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> C <sub>5</sub> D <sub>3</sub> D <sub>6</sub> E <sub>1</sub> F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> H <sub>4</sub> H <sub>6</sub> J <sub>1</sub> J <sub>3</sub> J <sub>4</sub> K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> K <sub>4</sub> L <sub>2</sub> L <sub>4</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> N <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> P <sub>1</sub> P <sub>2</sub>

Примечание. Код локуса: А – WMS349; В – WMC526; С – PSP3000; D – CFD76; E – WMC626; F – WMC276; G – WMC445; H – GDM33; I – WMC453; J – GPW2203; K – GPW2181; L – WMC216; M – BARC74; N – WMC104; O – WMS513; P – WMC273. Буквами латинского алфавита обозначены праймеры; нижний индекс – аллельное состояние локуса, который он маркирует.



**Рис. 2.** Филогенетическое древо изученных сортов пшеницы узбекистанской селекции, полученных с использованием 36 SSR-маркеров.

от 2 до 6, что в среднем составило 3 на локус. У локусов WMC526, CFD76, GDM33 и WMC104 установлено максимальное количество аллелей – шесть; у восьми локусов – WMS349, PSP3000, WMC453, GPW2203, GPW2181, BARC74, WMS443 и WMS295 – выявлено по пять аллелей, у локусов WMC626, WMC276, WMC445, WMC216, WMS513, WMC273, WMS291 и WMC432 – по четыре и у остальных (кроме CFD239) по два-три аллеля (табл. 2).

Эффективное число аллелей – показатель, характеризующий локусы по частоте встречаемости аллелей, – в изученной группе генотипов варьировало от 1.7 (BARC187) до 4.8 (WMS349), в среднем 2.8 на локус. Величина ожидаемой гетерозиготности в нашей популяции пшеницы соответствовала в среднем 0.626, изменяясь от 0 (CFD239) до 0.792 (WMS349). Размеры амплифицированных продуктов находились в пределах от 93 до 552 п. н. Для анализа данных амплификации микросателлитной ДНК использовали индекс полиморфного информационного содержания, который варьировал от 0 (для маркера CFD239) до 0.758 (WMS349), составляя в среднем 0.564 (см. табл. 1).

На основании набора аллелей микросателлитных локусов была построена дендрограмма, отражающая филогенетические связи изученных сортов мягкой пшеницы. При иерархической кластеризации методом полной связи сорта разделились на два основных кластера (рис. 2), причем распределение и состав древовидной кластеризации в большинстве своем совпали с результатами, полученными с применением метода k-средних (рис. 3).

Сорта пшеницы узбекистанской селекции, за исключением нескольких местных (Pahlavon и Farovon, выведенных из местного сорта Маржон) и стародавних сортов Boysuntura и Oqmarvarid, являются генотипами, полученными из различных мировых коллекций и адаптированными к местным условиям культивирования. Генотипы первого кластера, а именно: Elomon, Gozgon, Matonat, Dostlik, Bardosh, Barhayot, Turkiston и Kelajak, созданы в Кашкардарьинском научно-исследовательском институте селекции и семеноводства зерновых колосковых культур (Узбекистан) на основе образцов из коллекции СИММИТ (Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы), при этом превалировал отбор по признаку «засухоустойчивость».

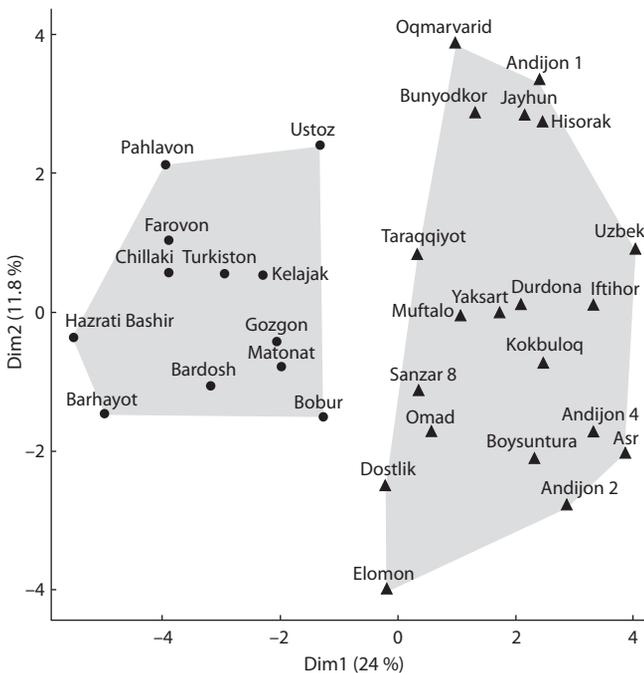


Рис. 3. Кластеризация методом k-средних изученных сортов пшеницы узбекистанской селекции на основе 36 SSR-маркеров.

Генотипы второго кластера, за исключением сорта Oqmarvarid, созданы Научно-исследовательским институтом зерна и зернообовых культур (Андижан, Узбекистан) в сотрудничестве с Краснодарским научно-исследовательским институтом сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (см. рис. 2). В правую подгруппу этого кластера объединяются сорта, отобранные по урожайности (Yaksart, Taraqqiyot, Sanzar 8, Muftalo, Omad, Durdona, Uzbek, Bunyodkor, Hisorak, Jayhun, Ustoz и Andijon 1), а в левую – сорта, районированные в Галляаральском районе (Узбекистан) и адаптированные к богарному земледелию (Kokbuloq, Andijon 4, Boysuntura, Andijon 2, Asr и Iftihor).

Значения *PIC*, полученные в результате генотипирования, находятся в пределах, достаточных для идентификации и паспортизации сортов. В табл. 2 представлен фрагмент молекулярного паспорта, разработанного для перспективных сортов мягкой озимой пшеницы отечественной селекции при использовании 16 наиболее эффективных и информативных SSR-маркеров с показателями  $PIC \geq 0.6$ .

Для примера мы взяли сорта Hazrati Bashir и Andijon 1 как генотипы, максимально удаленные друг от друга в многомерном пространстве, и сорта Bobur и Dostlik, имеющие, напротив, генетическую близость (см. рис. 2 и 3).

Как видно из табл. 2, некоторые наборы аллелей, в частности  $V_1V_2V_3$ ,  $H_1H_2$ ,  $L_2L_4$  и  $N_1N_2$ , амплифицируемых праймерными парами WMC526, GDM33, WMC216 и WMC104 соответственно, детектируются у всех четырех генотипов, независимо от того, в какой кластер они сгруппированы. Поскольку эти локусы отмечаются и в большинстве остальных исследованных сортов, их, по-видимому, можно признать видоспецифическими. С другой стороны, есть сорта, в том числе Bobur, не содержащие ни одно-

го аллеля локусов WMC445 и WMC453, что, возможно, является характерной особенностью этих генотипов.

Таким образом, нами проведены скрининг и оценка генетического разнообразия 32 сортов мягкой озимой пшеницы узбекистанской селекции с использованием 36 микросателлитных SSR-маркеров. Исследования выявили наличие определенной генетической вариативности как по количеству аллелей на локусах, так и по индексу генетического разнообразия. Показано, что изученные сорта кластеризуются в соответствии с их эколого-географическим и селекционным происхождением. Наряду с этим нами разработана генетическая формула, которая может быть использована для идентификации, паспортизации этих сортов и при подборе родительских пар в селекционных программах по пшенице.

### Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта Т.8-16 «Сравнительное изучение полиморфизма ДНК различных сортов мягкой пшеницы узбекистанской селекции с использованием микросателлитных SSR-маркеров», финансируемого Фондом поддержки фундаментальных исследований Академии наук Республики Узбекистан.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

- Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров. Генетика. 2005;41(4):480-492. [Gostimsky S.A., Kokaeva Z.G., Kononov F.A. Studying plant genome variation using molecular markers. Russian Journal of Genetics. 2005;41(4):378-388. DOI 10.1007/s11177-005-0101-1.]
- Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. Усп. соврем. биологии. 2004;124(3):260-271. [Sulimova G.E. DNA markers in genetic studies: types of markers, their properties, and applications. Uspekhi Sovremennoy Biologii = Advances in Current Biology. 2004;124(3):260-271. (in Russian)]
- Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. С.-х. биология. 2015;50(5):571-578. DOI 10.15389/agrobiol.2015.5.571rus. [Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2015;50(5):571-578. (in Russian)]
- Ayala F., Kiger J. Modern Genetics. Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings Publ. Co., 1984.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1983;1(4):19-21.
- Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Gale M.D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. Theor. Appl. Genet. 1995;90:247-252.
- Guyomarc'h H.I., Sourdille P., Charmet G., Edwards J., Bernard M. Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. Theor. Appl. Genet. 2002;104(6-7):1164-1172.
- Khurshut E.E., Adylova A.T., Norbekov J.K., Kushanov F.N., Turaqulov Kh.S. Molecular analysis of winter wheat varieties in Uzbekistan. Uzb. Biol. J. 2017;(3):44-48.
- Lowe I., Jankuloski L., Chao S., Chen X., See D., Dubcovsky J. Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broad-

- ly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:143-157.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76:5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Nei M., Roychoudhury A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics.* 1974;76:379-390.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2016. Available at <https://www.R-project.org>.
- Röder M.S., Korzun V., Wandehake K., Planschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998; 149:2007-2023.
- Somers D.J., Peter I., Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1105-1114.
- Song Q.J., Fickus E.W., Cregan P.B. Characteristics of trinucleotide markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;104:286-293.
- Sourdille P., Gandon B., Chiquet V., Nicot N., Somers D., Murgueux A., Bernard M. Wheat génoplante SSR mapping data release: a new set of markers and comprehensive genetic and physical mapping data. 2004. Available at: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical>. Accessed on March 10, 2010.
- Zhao H.X., Liu X.M., Chen M.-S. H22, a major resistance gene to the Hessian fly (*Mayetiola destructor*), is mapped to the distal region of wheat chromosome 1DS. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:1491-1496.

# SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы

С.И. Вакула<sup>1</sup>✉, О.А. Орловская<sup>1</sup>, Л.В. Хотылева<sup>1</sup>, А.В. Кильчевский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Национальная академия наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Зерно кукурузы (*Zea mays* L.) – наиболее широко используемый в мире источник натурального крахмала, что обусловлено как возможностью получения крахмала с различным соотношением амилоза/амилопектин, так и высокой продуктивностью культуры. В качестве компонента функционального питания перспективна кукуруза с «нетрадиционным» составом зерна (восковидная, маслянистая, сахарная, opak и другие фенотипические варианты). К формированию восковидного эндосперма с высоким содержанием амилопектина приводят мутации гена *waxy*, нарушающие структуру и функцию фермента биосинтеза амилозы. Рецессивная природа мутаций гена *waxy* не позволяет проводить фенотипический отбор гетерозиготных носителей в гибридной популяции. Высокая частота и гетерогенная природа мутаций, нарушающих биосинтез амилозы, затрудняют однозначную идентификацию молекулярной природы возникших генетических изменений. Известно, что внутри нетранслируемых участков гена *waxy* присутствуют микросателлитные повторы. Задача настоящего исследования – оценить эффективность использования микросателлитных последовательностей локуса *waxy* для идентификации и маркирования генотипов восковидной кукурузы. Для ее решения было проанализировано содержание крахмала, короткоцепочечных растворимых углеводов, амилозы, амилопектина в зерне 33 образцов кукурузы. Идентифицированы группы образцов со сходным углеводным составом эндосперма, в том числе 13 высокоамилопектиновых образцов, носителей мутаций гена *waxy* (*wx*), и 20 образцов с фенотипической нормой признака (*Wx*). Молекулярно-генетический скрининг образцов коллекции включал анализ полиморфизма микросателлитных локусов *phi022*, *phi027*, *phi061*, ассоциированных с последовательностью гена *waxy*. Аллельный состав отдельных локусов и их сочетаний соотнесен с накоплением запасных углеводов в эндосперме зерна. Дифференцировать группы образцов кукурузы с диким *Wx* и мутантным фенотипом *wx* позволил только анализ сочетания аллелей локусов *phi022* и *phi027* либо комплекса всех трех маркеров. Таким образом, для маркер-ассоциированного отбора образцов кукурузы с высоким накоплением амилопектина в эндосперме могут представлять интерес не отдельные аллели локусов *phi022*, *phi027*, *phi061*, а их уникальные сочетания.

Ключевые слова: кукуруза; запасные углеводы; крахмал; амилопектин; амилоза; ген *waxy*; микросателлитные маркеры.

## SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm

S.I. Vakula<sup>1</sup>✉, O.A. Orlovskaya<sup>1</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>, A.V. Kilchevsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> The National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

As a component of functional nutrition, maize cultivars with “non-traditional” kernel composition (waxy, oil-bearing, sugar, opaque, etc. phenotypic variants) are promising. Mutations in the *waxy* gene, which break down the structure and function of the enzyme for amylose biosynthesis, lead to a waxy (with a high content of amylopectin) endosperm formation. High variability of the *waxy* gene limits the use of microsatellite loci in marker associated selection of waxy maize genotypes. The increased frequency of gene rearrangements within the *waxy* locus facilitated the origination of many high-amylopectin corn lines carrying different SSR allelic variants. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of using *waxy* locus microsatellite sequences for identification and labeling of *waxy* maize genotypes. To this end, a complex of biochemical (calorimetry, bichromate method), molecular-genetic (SSR-PCR, capillary gel electrophoresis with fluorescent detection of fragments) and statistical (descriptive statistics, cluster analysis,  $\chi^2$ ) analysis methods was used. Plant material used were 33 samples of corn kernels including mutant forms with a high content of amylose, amylopectin, short-chain starches, were kindly provided by VIR genetic collection (Russian Federation) and Maize Genetics Cooperation Stock Center (USA). The contents of starch, short-chain soluble carbohydrates, amylose, amylopectin in the grain of 33 maize samples were evaluated. Compositionally similar (to endosperm carbohydrates content) groups of samples were identified. They include 13 high-amylopectin samples carriers of *waxy* (*wx*) gene mutations and 20 samples with wild-type character (*Wx*). Molecular genetic screening of the collection included an analysis of the polymorphism of the microsatellite loci *phi022*, *phi027*, *phi061* associated with the *waxy* gene sequence. Allelic composition of individual loci and their combinations were analyzed in relation to the accumulation of reserve carbohydrates in the kernel endosperm. Only the analysis of the *phi022/phi027* combination or all three

markers in the complex allows differentiating the wild *Wx* and mutant *wx* phenotypes of maize. It was shown that not the individual allelic polymorphisms of the *phi022*, *phi027*, *phi061* loci are efficient for the marker-associated selection of high-amylopectin maize, but their unique combinations.

Key words: maize; reserve carbohydrates; starch; amylopectin; amylose; *waxy* gene; microsatellite markers.

**КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:**

Вакула С.И., Орловская О.А., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):640-647. DOI 10.18699/VJ18.405

**HOW TO CITE THIS ARTICLE:**

Vakula S.I., Orlovskaya O.A., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):640-647. DOI 10.18699/VJ18.405 (in Russian)

Крахмал является одним из основных компонентов рациона человека и кормов сельскохозяйственных животных (Pan, 2000). Важный источник пищевого крахмала – зерно кукурузы (*Zea mays* L.), что обусловлено высокими мировыми сборами культуры (<http://apps.fao.org>) и широким генетическим разнообразием процессов биосинтеза углеводов в эндосперме (Wilson et al., 2004).

В состав природного крахмала входят две структурные фракции: линейная амилоза ( $\alpha$ -(1→4)-глюкан) и разветвленный амилопектин ( $\alpha$ -(1→4; 1→6) глюкан) (Tan et al., 2009). Соотношение амилозы и амилопектина определяет химические свойства и востребованность вариантов крахмала для различных отраслей промышленности. В среднем крахмал кукурузы содержит 15–25 % амилозы и 75–86 % амилопектина. Высокоамилозный крахмал, получаемый из мутантных по гену *amylose extender* кукурузных зерен, устойчив к воздействию пищеварительных ферментов и служит перспективным источником диетических волокон (Nugent, 2005). Особая структура эндосперма, высокая пищевая ценность, низкие температуры желатинизации и клейстеризации запасного крахмала способствовали росту спроса на восковидную кукурузу (Lambert, 2001; Jobling, 2004). «Восковидный эндосперм» зерна кукурузы – моногенный признак, обусловленный рецессивной мутацией гена *waxy* (*wx/wx*), кодирующего фермент гранул-связующую гликозил-трансферазу (ГСГТ) (Alexander, Creech, 1977; Li, 2003). Лocus *Wx* экспрессируется в эндосперме развивающихся зерен и пыльцевом зерне. Мутации, нарушающие функции ГСГТ, резко подавляют синтез амилозы и способствуют увеличению содержания амилопектина в крахмале до 99 %.

Помимо высокой хозяйственной ценности, растения, мутантные по локусу *wx*, – прекрасная модельная система для изучения механизмов генетической изменчивости, в частности перемещения мобильных элементов, генетического дрейфа, молекулярной эволюции и стабильности генома. Последовательность дикого варианта гена *waxy* расшифрована (Klosgen et al., 1986). Недавно опубликованы результаты секвенирования локуса у ряда местных сортов и культурных линий кукурузы (Tian et al., 2008; Fan et al., 2009; Bao et al., 2012). Последовательность гена (3718 п. н.) представлена 13 интронами (81–139 п. н.) и 14 экзонами (64–392 п. н.), размер транскрибируемого белка составляет 605 аминокислотных остатков (Klosgen et al., 1986). На молекулярном уровне описано более 50 мута-

ций *waxy* (Huang et al., 2010). Структурный анализ этих аллелей показал, что в возникновении спонтанных мутаций локуса большую роль играют инсерции и делеции, вызванные перемещениями мобильных элементов генома (Wessler, Vagaron, 1985).

Рецессивная природа мутации гена *waxy* не позволяет проводить фенотипический отбор гетерозиготных носителей в гибридной популяции. Высокая частота и гетерогенная природа мутаций, нарушающих биосинтез амилозы, затрудняет однозначную идентификацию молекулярной природы возникших генетических изменений. Согласно базе данных Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence et al., 2008), с геном *waxy* ассоциированы короткие тандемные повторы *phi022*, *phi027* и *phi061*. Эти внутригенные SSR-маркеры могут быть использованы для проведения маркер-ассоциированного отбора носителей мутации *wx* (Yang, 2013). Однако в литературе мало данных о соответствии между размерными вариантами локусов *phi022*, *phi027*, *phi061* и ферментативной активностью ГСГТ (Dang, 2010). Таким образом, целью исследования являлась оценка эффективности использования микросателлитных последовательностей *waxy*-локуса для идентификации и маркирования генотипов восковидной кукурузы.

## Материалы и методы

Растительный материал – зерно 33 образцов кукурузы различного генетического и экологического происхождения. Из фондов ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), (г. Санкт-Петербург, Россия) были любезно предоставлены одиннадцать самоопыленных линий восковидной кукурузы российской селекции (АД42, АД174, АД37, АД187-8-1, АД25, АД27, АД96, АД117, АД17, АД1-4480, АД48-40); четыре североамериканских образца кукурузы с повышенным содержанием амилозы в эндосперме (Высокоамилозная (К-15542), Bear High amylose, With Carotin, Мо31ae). Десять образцов сахарной кукурузы (Country Gentlemen, 5010, Golden Bantam, Black Mexican, Golden Bantam-2, Early June, Burbank Early, Black Mexican-2, Howling Mob, Golden Evergreen) относятся к уникальной части коллекции ВИР, собранной экспедицией Н.И. Вавилова в 1921–1922 гг. (США и Канада). Восемь образцов кукурузы (517B *ae1*<sup>oh43</sup>, 517B *ae1*<sup>w64A</sup>, 909D *c1sh1wx1*, 510B *Ae1*-5180:Mu1,

M541 aelwx1, 915A wx1^w64A, 915A wx1^oh43, 912A sh1^oh43), несущих мутации в генах биосинтеза запасных углеводов зерна, любезно предоставлены фондовым центром семян Maize Genetics Cooperation Stock Center (Иллинойс, США).

Концентрацию растворимых редуцирующих сахаров и гидролизного крахмала в эндосперме зерна кукурузы оценивали с использованием бихроматного метода по ГОСТ 5903-89 п. 6.2. (2004). Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре в кюветках с толщиной слоя 1 см при пяти длинах волн: 630, 640, 650, 660 и 670 нм. Для каждой пробы (три биологические и три химические повторности на образец) измерения повторяли три раза. Экстракцию и гидролиз кукурузного крахмала проводили согласно методам, описанным в ГОСТ 10845-98 (2001). Содержание амилопектина в обезжиренной муке эндосперма зерна кукурузы измеряли калориметрически по реакции с йодом. Для извлечения крахмала из муки использовали метод, предложенный С.А. Knutson (1986). Для каждого образца муки анализ проводили в трехкратной биологической и четырехкратной химической повторностях. Содержание фракции амилопектина оценивали относительно стандарта (Amylopectin from maize, 10120-SIGMA) при длине световой волны 620 и 535 нм, что соответствует максимуму поглощения комплексов амилоза-I<sub>2</sub> и амилопектин-I<sub>2</sub> (Hoeverkamp-Hermelink et al., 1988). Содержание амилозы в образце рассчитывали как 100 % (общее содержание двух фракций крахмала) минус содержание амилопектина.

Информация об использованных в работе микросателлитных маркерах *phi022*, *phi027* и *phi061* получена из базы данных Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence et al., 2008). Состав реакционной смеси и условия проведения полимеразной цепной реакции описаны в статье (Yu et al., 2012). Продукты амплификации разделяли с использованием капиллярного гель-электрофореза на анализаторе ABI PRISM 3500. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения GeneMapper Software 5.

Статистическую обработку данных проводили в программах MS Excel, Statistica 10.0. В работе применены алгоритмы кластерного анализа по методу *k*-средних, непараметрического корреляционного анализа, описательной статистики количественных признаков, таблицы сопряженности с оценкой достоверности распределения по критерию  $\chi^2$ . Для оценки генетического разнообразия коллекции кукурузы использовали программное обеспечение GenAIEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006), реализующее следующие алгоритмы расчета:

$$F_x = (2N_{xx} + N_{xy}) / 2N, \quad (1)$$

где  $F_x$  – частота встречаемости аллеля  $x$  кодоминантного локуса;  $N_{xx}$  – количество гомозигот по аллелю  $x$ ,  $N_{xy}$  – количество гетерозигот, содержащих аллель  $x$ ;  $N$  – число образцов;

$$N_e = 1 / \sum F_i^2, \quad (2)$$

где  $N_e$  – эффективное число аллелей локуса;  $F_i$  – частота  $i$ -го аллеля локуса;

$$H_o = N_{xy} / N, \quad (3)$$

где  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность локуса;  $N_{xy}$  – количество гетерозигот,  $N$  – число образцов;

$$PIC = 1 - \sum (F_i)^2, \quad (4)$$

где  $PIC$  – индекс полиморфизма локуса;  $F_i$  – частота  $i$ -го аллеля локуса.

## Результаты и обсуждение

Комплекс калориметрических методов анализа позволил оценить содержание в эндосперме зерна кукурузы короткоцепочечных растворимых углеводов (КРУ), крахмала и его фракций (амилопектин и амилоза). Из 33 проанализированных генотипов минимальное накопление крахмала (39.60 %) отмечено в эндосперме сахарной кукурузы Howling Mob, максимальное (94.58 %) – в зернах АД27. Сахаристость эндосперма варьировала от 0.1 % (517B ael^w64A) до 30 % у образца Burbank Early. У некоторых образцов коллекции (АД17, АД1-4480, 915A wx1^w64A, 909) доля амилопектина в крахмале превышала 99 %. Наиболее высокая концентрация амилозы (более 25 %) установлена в эндосперме сортов Bear High amilose и With Carotin. Высокие коэффициенты вариации отмечены для признаков «содержание КРУ» ( $\bar{X} = 9.39$  %;  $V = 82.75$  %), «доля амилозы в крахмале» ( $\bar{X} = 12.62$  %;  $V = 74.01$  %). Общее содержание крахмала в эндосперме ( $\bar{X} = 67.55$  %;  $V = 22.84$  %) и концентрация в нем амилопектина ( $\bar{X} = 87.38$  %;  $V = 10.69$  %) характеризуются более узким диапазоном изменчивости в изученной коллекции кукурузы.

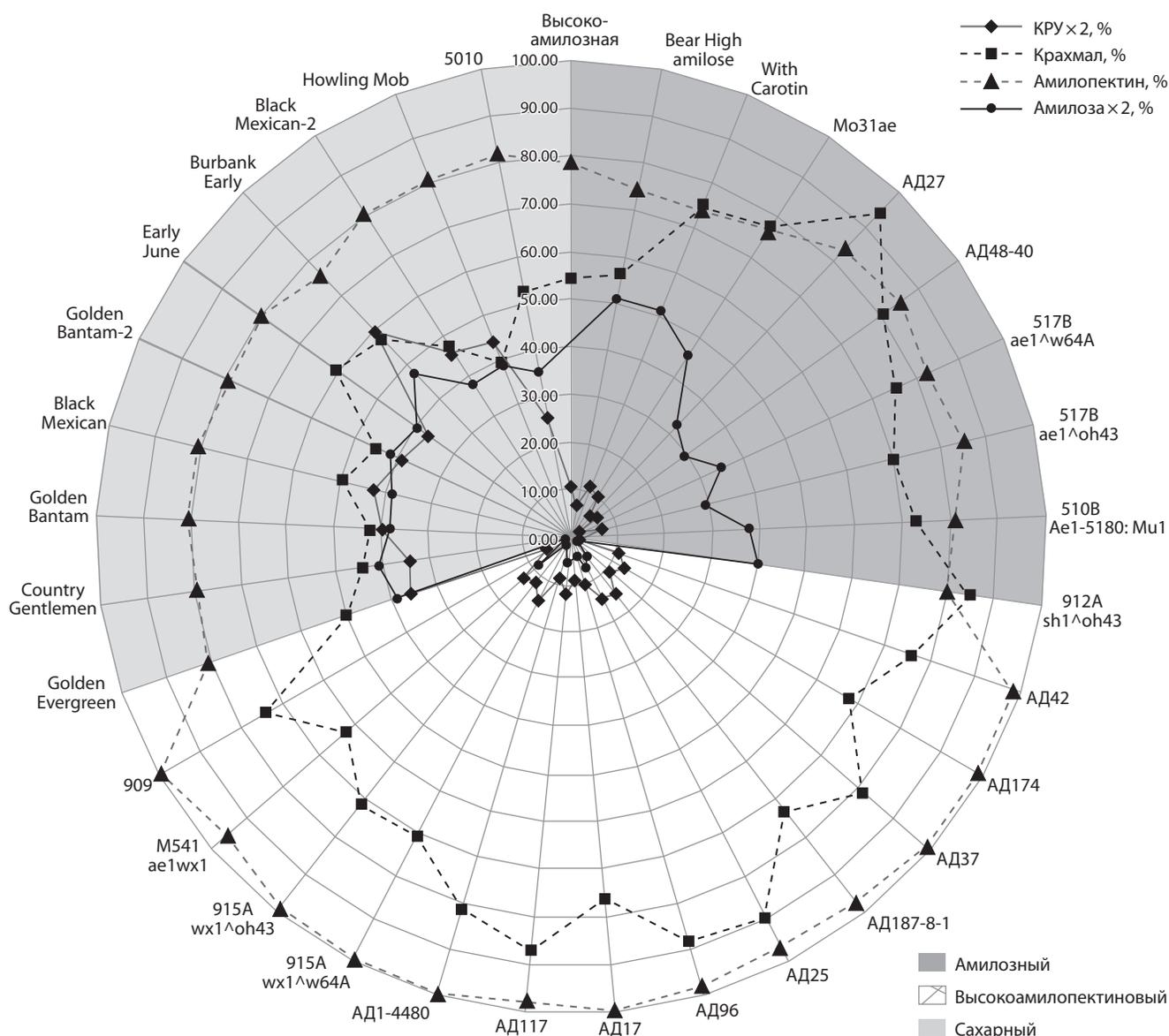
Для оценки связи между накоплением различных классов запасных углеводов в эндосперме кукурузы использовали непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Обратная зависимость ( $r^s = -0.66$ ) между уровнем короткоцепочечных растворимых углеводов и накоплением крахмала в эндосперме зерна, вероятно, обусловлена перераспределением метаболитов (УДФ-глюкозы) в сторону синтеза фитогликогена и декстранов у растений, мутантных по генам сахаросинтаз (образцы сахарной кукурузы). Концентрация амилопектина в эндосперме кукурузы положительно коррелирует с общим содержанием крахмала ( $r^s = 0.45$ ). Таким образом, нонсенс/миссенс мутации гена *waxy*, приводящие к изменению размера и структуры зерен крахмала, не оказывают негативного влияния на уровень накопления запасных полисахаридов в зерне. Так, в работе (Cui et al., 2014) в эндосперме мутантов *waxy* средний диаметр гранул крахмала превышал показатели образцов попкорна, зубовидной и сладкой кукурузы. По данным X. Yu с коллегами (2015), мучнистая фракция эндосперма традиционных и восковидных образцов кукурузы содержит более крупные, сферические по форме гранулы крахмала, окруженные большим количеством алейроновых зерен; в стекловидных участках эндосперма таких сортов зерна крахмала приобретают полигональную форму. Сорта сахарной кукурузы, изученные авторами, отличались более низким средним содержанием крахмала, округлыми, небольшими крахмальными зёрнами, высокой долей амилозы и растворимых сахаров в составе эндосперма.

Образцы коллекции классифицированы согласно уровню накопления запасных углеводов в эндосперме семян с использованием кластерного анализа по методу *k*-средних. Выделено три *k*-кластера образцов, достоверно различающихся по среднему значению содержания КРУ, крахмала, амилозы и амилопектина в семенах (табл. 1).

**Таблица 1.** Кластеризация методом *k*-средних образцов кукурузы, различающихся по уровню накопления запасных углеводов в эндосперме семян (две итерации, максимизация расстояний между центрами кластеров)

Признак, %	Среднее в <i>k</i> -кластере			F-статистика Фишера	<i>p</i>
	1	2	3		
Короткоцепочечные растворимые углеводы	3.37	5.71	20.19	112.38	$1.2 \cdot 10^{-14}$
Крахмал	74.23	76.77	48.86	29.42	$8.5 \cdot 10^{-8}$
Амилопектин	80.32	98.39	80.13	203.37	$3.6 \cdot 10^{-18}$
Амилоза	19.68	1.61	19.87	203.37	$3.6 \cdot 10^{-18}$

Примечание. *k*-кластеры: 1 – Амилозный; 2 – Высокоамилопектиновый; 3 – Сахарный.



**Рис. 1.** Содержание запасных углеводов в эндосперме семян кукурузы.

Первый *k*-кластер (на рис. 1 – сектор между образцами высокоамилозная – 912A *sh1^oh43*, далее – Амилозный) объединяет 10 образцов, накапливающих низкие уровни КРУ, более 55 % запасного крахмала, с концентрацией в нем амилозы не менее 14.5 %. Согласно данным, представ-

ленным ВИР и Maize Genetics Cooperation Stock Center, образцы этого кластера несут мутации в генах семейства *amylose extender* (*ae*). Известно, что содержание амилозы у линий кукурузы с мутантным аллелем *ae* может достигать 50 % и более (Bear et al., 1958). Однако, по нашим данным,

**Таблица 2.** Показатели полиморфизма микросателлитных локусов гена *waxy*

Локус	$N_a$	$F$	$N_e$	$H_o$	$PIC$
<i>phi022</i>	<i>phi022</i> <sub>134</sub>	0.91	1.2	0.06	0.17
	<i>phi022</i> <sub>140</sub>	0.09			
<i>phi027</i>	<i>phi027</i> <sub>148</sub>	0.27	2.95	0.27	0.66
	<i>phi027</i> <sub>153</sub>	0.38			
	<i>phi027</i> <sub>163</sub>	0.35			
<i>phi061</i>	<i>phi061</i> <sub>86</sub>	0.27	1.66	0.24	0.40
	<i>phi061</i> <sub>94</sub>	0.73			

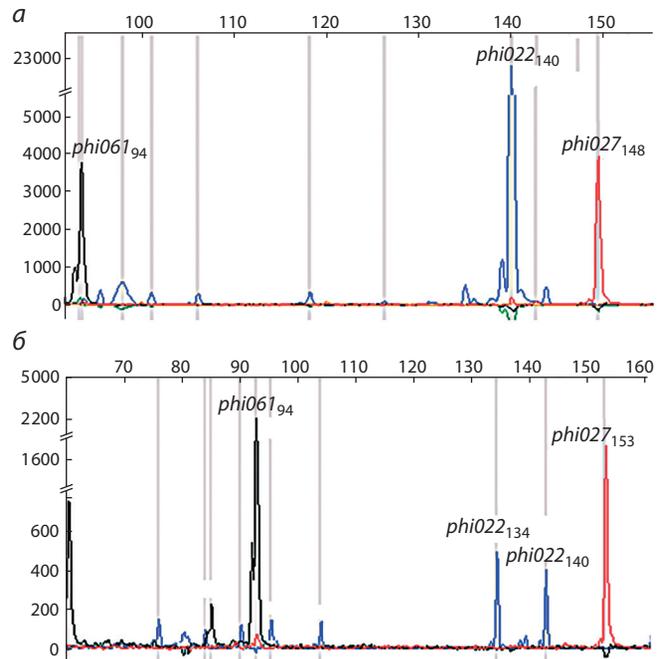
Примечание.  $N_a$  – выявленные аллели;  $F$  – частота аллеля;  $N_e$  – эффективное число аллелей локуса;  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность;  $PIC$  – индекс полиморфизма.

содержание амилозы в образцах кукурузы этого кластера не превышает 25.6 %. Вероятно, оценка содержания амилозы на основании калориметрии продуктов аффинного связывания компонентов крахмала с йодом, использованная нами, дает заниженные результаты, что показано в работе (Wang et al., 1993). Кроме того, эти генотипы могут содержать мутации и других генов биосинтеза крахмала, что также оказывает влияние на эффект гена *ae*.

Тринадцать образцов второго кластера (на рис. 1 – сектор АД-42 – 909, далее – Высокоамилопектиновый) относятся к высококрахмалистым, высокоамилопектиновым образцам с низким накоплением КРУ в эндосперме. В состав этого кластера вошли образцы с нарушением функций гена *waxy* (участвующего в синтезе амилозы фермента ГСГТ). Образец M541 *ae1wx1*, отнесенный алгоритмом *k*-средних к образцам с высоким содержанием амилопектина, несет мутации двух ключевых генов биосинтеза крахмала (*waxy* и *amylose extender*, данные приведены, согласно Maize Genetics and Genomics Database). Известно, что эффекты генов *waxy* и *amylose extender* комплементарны. По сравнению с восковидной кукурузой, крахмал *ae1wx* содержит более длинные полигликановые цепи и по физическим свойствам близок к фракции амилопектина растений, мутантных по гену *ae*.

Третий кластер – десять образцов сахарной кукурузы с высоким содержанием КРУ, с долей крахмала в эндосперме менее 55 % (на рис. 1 – сектор Golden Evergreen – 5010, далее – Сахарный). Кластер сахарной кукурузы, вероятно, сформирован образцами, несущими дефектные варианты генов, кодирующих ферменты биосинтеза амилопектина – изоамилазу (гены *sugary kernel*, *su* и *sugary-enhancer1*, *se1*), сахаросинтазу (*shrunken1*, *sh1*) или ADPATP (*brittle endosperm1*, *bt1*).

Расстояние между центрами конечных *k*-кластеров составило 1.85 евклидовых единиц (ЕЕ) для пары Амилозный – Сахарный, 1.90 ЕЕ – для пары Высокоамилопектиновый – Сахарный и 3.60 ЕЕ – для пары Амилозный – Высокоамилопектиновый. При этом среднее расстояние между образцами, принадлежащими одному кластеру, составило 0.26–0.44 ЕЕ, а максимальное не превышало 0.73 ЕЕ (между образцом Bear High amylose и конечным центром кластера Амилозный). Таким образом, получен-



**Рис. 2.** Электрофореграмма образцов: а – АД96 (Высокоамилопектиновый *k*-кластер); б – 517В ae1^oh43 (Амилозный *k*-кластер).

ное решение для классификации образцов кукурузы по уровню накопления запасных полисахаридов в зерне является оптимальным. Образцы кукурузы, отнесенные к Высокоамилопектиновому кластеру, были использованы как экспериментальная выборка для анализа частот встречаемости SSR-маркеров гена *waxy*. В качестве контроля были использованы образцы кластеров Амилозный и Сахарный.

В настоящее время известно более 40–50 мутантных вариантов локуса *waxy*, часть из которых фенотипически нестабильна и обусловлена встраиванием в последовательность гена мобильных элементов (например, система *Activator-Dissociation* и др.) (Huang et al., 2010). Исходный аллельный вариант гена до сих пор не известен. Наиболее вероятное место происхождения восковидной кукурузы (данные морфологии, кариотипа, анализа изоферментов и ДНК-маркеров) – китайский регион Yunnan-Guangxi (Fan et al., 2009), а предковая форма – неглютинозные сорта интродуцированной в Китае около 500 лет назад американской кукурузы (Liu et al., 2005; Hao et al., 2015). На основании данных RAPD-, SSR- и SNP-анализа генетическое разнообразие местных сортов и инбредных линий восковидной кукурузы оценивается как существенное, подтверждены генетические различия восковидных и традиционных сортов кукурузы (Zheng et al., 2013; Hao et al., 2015).

По данным Maize Genetics and Genomics Database, в промоторной и кодирующей областях гена *waxy* (Klosgen et al., 1986) расположены три микросателлитных повтора: *phi022*, *phi027*, *phi061*. Проведена оценка генетического разнообразия 33 образцов кукурузы, выявляемого с использованием данных трех SSR-маркеров (табл. 2, рис. 2). В исследуемой коллекции локусы *phi022* и *phi061*

представлены в двух аллельных вариантах: *phi022*<sub>134</sub> и *phi022*<sub>140</sub> (ампликоны длиной 134 и 140 п. н.), *phi061*<sub>86</sub> и *phi061*<sub>94</sub> (ампликоны длиной 86 и 94 п. н.). Для маркера *phi027* отмечено три аллеля: *phi027*<sub>148</sub>, *phi027*<sub>153</sub>, *phi027*<sub>163</sub> (ампликоны длиной 148, 153, 163 п. н. соответственно). Для локуса *phi027* отмечены самые высокие значения показателей «эффективное число аллелей» ( $N_e$ ), «наблюдаемая гетерозиготность» ( $H_o$ ), «индекс полиморфизма» ( $PI_C$ ) (см. табл. 2). В локусе *phi022* ген *waxy* наименее изменчив, частота минорного аллеля *phi022*<sub>140</sub> составила всего 9%, а наблюдаемая гетерозиготность маркера – 0.06. В среднем по трем SSR-маркерам эффективное число аллелей составило  $1.94 \pm 0.47$ , наблюдаемая гетерозиготность –  $0.19 \pm 0.01$ , индекс полиморфизма –  $0.41 \pm 0.04$ . Согласно (Botstein et al., 1980), такие показатели соответствуют среднему уровню генетического разнообразия выборки.

Для оценки ассоциации аллельных вариантов маркеров *phi022*, *phi027*, *phi061* с показателями биохимического состава зерна использовали двухходовые таблицы сопряженности с оценкой достоверности различия распределения аллелей в группах образцов по критерию  $\chi^2$  Пирсона. В анализ включили: частоты встречаемости индивидуальных аллелей SSR-локусов, сочетания двух аллелей одного локуса, сочетания аллелей двух-трех SSR-локусов.

Однозначно дифференцировать носителей мутантного варианта гена *waxy* на основании анализа частот встречаемости отдельных аллелей *phi022* и *phi061*, *phi027*, а также их гомо/гетерозиготного состояния в локусе не представляется возможным (табл. 3). Высокие значения вероятности формирования фенотипа *waxy* (*wx* – восковая кукуруза) при наличии определенного SSR-аллеля получены для локуса *phi061* ( $\chi^2 = 5.39$ ;  $p = 0.02$ ). Для локусов *phi022* и *phi027* статистическая достоверность рассматриваемой гипотезы (ассоциация признак-маркер) низка. Рассмотрение частот аллелей в экспериментальной и контрольной группе показало, что у образцов восковидной кукурузы чаще встречаются варианты *phi022*<sub>140</sub>, *phi061*<sub>94</sub>, реже – *phi022*<sub>134</sub>, *phi061*<sub>86</sub> (см. табл. 3). Не отмечено также значимых ассоциаций между гомо/гетерозиготным состоянием локуса и формированием восковидного эндосперма. У *wx*-мутантов относительно чаще встречались носители аллельных сочетаний *phi022*<sub>140</sub>*phi022*<sub>140</sub> и *phi061*<sub>94</sub>*phi061*<sub>94</sub> (см. табл. 3), реже гомозиготы – *phi061*<sub>86</sub>*phi061*<sub>86</sub>.

Проведен анализ встречаемости сочетаний аллельных вариантов двух (рис. 3, а–в) и трех SSR-локусов (см. рис. 3, з) у форм восковидной кукурузы и образцов с диким вариантом гена. Согласно критерию  $\chi^2$ , распределение анализируемых комбинаций аллелей в двух фенотипических группах значимо различается ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ). Из трех генотипических вариантов по локусам *phi022* и *phi061* сочетание аллелей *phi022*<sub>134</sub>*phi061*<sub>94</sub> наиболее широко распространенное. Образцы с более редкими сочетаниями аллелей в группах восковидной и невосковидной кукурузы распределены неравномерно, так, вариант *phi022*<sub>140</sub>*phi061*<sub>94</sub> чаще отмечался у форм с восковидным фенотипом зерна, комбинация *phi022*<sub>134</sub>*phi061*<sub>86</sub> – у *Wx*-образцов. В группе образцов восковидной куку-

**Таблица 3.** Частота встречаемости (%) аллельных вариантов SSR-локусов в группах образцов кукурузы с различным накоплением амилопектина в эндосперме

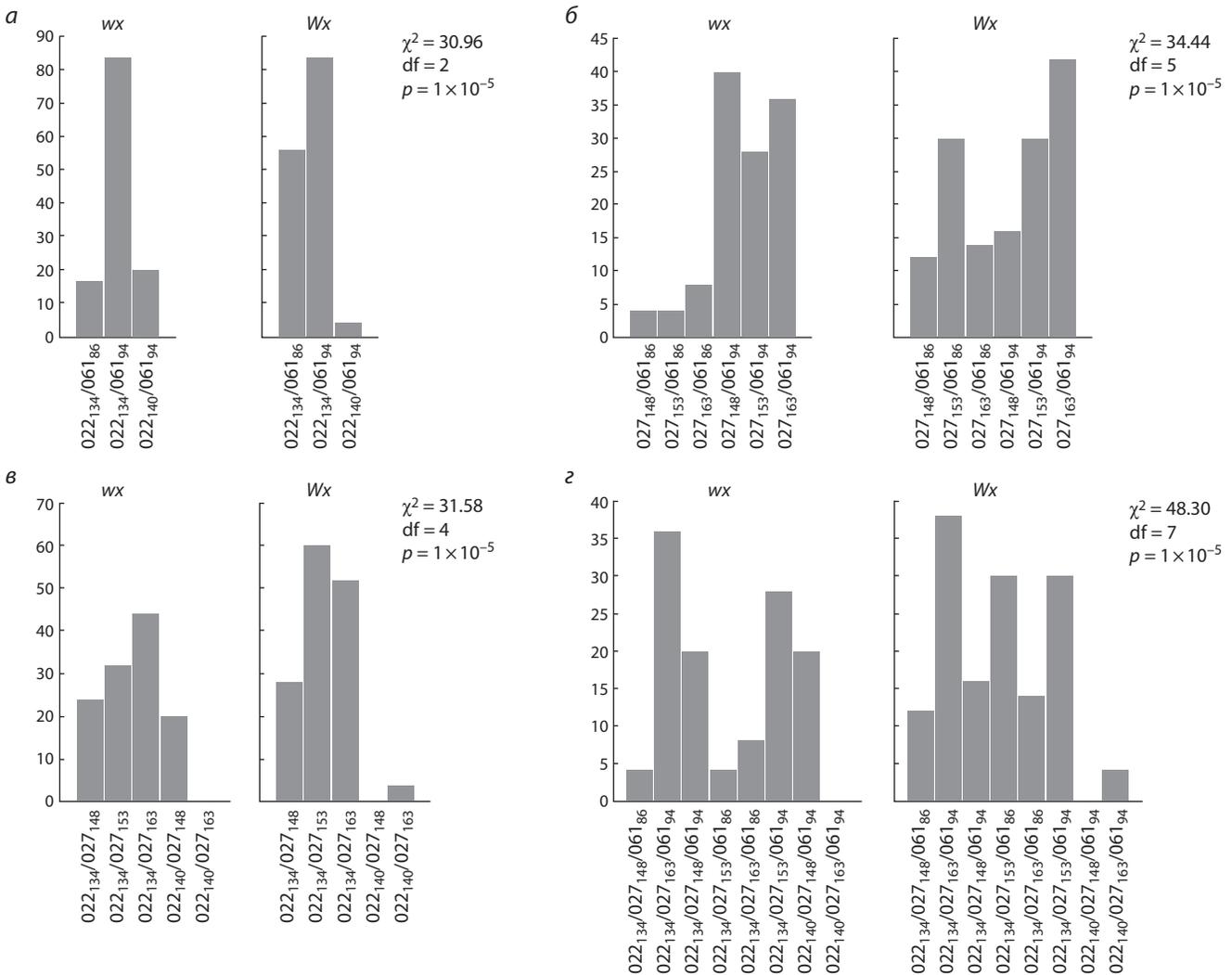
Аллель	Фенотипический вариант		$\chi^2$	$p$
	<i>Wx</i>	<i>wx</i>		
<i>phi022</i> <sub>134</sub>	53.0	37.9	3.82	0.05
<i>phi022</i> <sub>140</sub>	1.5	7.6		
<i>phi027</i> <sub>148</sub>	10.6	16.7	2.86	0.24
<i>phi027</i> <sub>153</sub>	21.2	16.7		
<i>phi027</i> <sub>163</sub>	22.7	12.1		
<i>phi061</i> <sub>86</sub>	21.21	6.06	5.39	0.02
<i>phi061</i> <sub>94</sub>	33.3	39.4		
<i>phi022</i> <sub>134</sub> <i>phi022</i> <sub>134</sub>	51.52	36.36	2.61	0.27
<i>phi022</i> <sub>140</sub> <i>phi022</i> <sub>140</sub>	0.00	6.06		
<i>phi022</i> <sub>134</sub> <i>phi022</i> <sub>140</sub>	3.03	3.03		
<i>phi027</i> <sub>148</sub> <i>phi027</i> <sub>153</sub>	3.03	3.03	4.09	0.39
<i>phi027</i> <sub>153</sub> <i>phi027</i> <sub>153</sub>	12.12	15.15		
<i>phi027</i> <sub>148</sub> <i>phi027</i> <sub>148</sub>	9.09	15.15		
<i>phi027</i> <sub>163</sub> <i>phi027</i> <sub>163</sub>	12.12	9.09		
<i>phi027</i> <sub>153</sub> <i>phi027</i> <sub>163</sub>	18.18	3.03		
<i>phi061</i> <sub>86</sub> <i>phi061</i> <sub>86</sub>	12.12	3.03	4.36	0.11
<i>phi061</i> <sub>94</sub> <i>phi061</i> <sub>94</sub>	24.24	36.36		
<i>phi061</i> <sub>86</sub> <i>phi061</i> <sub>94</sub>	18.18	6.06		

Примечание. *Wx* – образцы Амилозного и Сахарного *k*-кластеров; *wx* – образцы кластера Высокоамилопектиновый.

рузы отмечено также накопление сочетания аллелей *phi027*<sub>148</sub>*phi061*<sub>94</sub> и относительное снижение частоты встречаемости варианта *phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>86</sub>.

Наиболее интересные результаты получены при анализе комбинаций аллелей локусов *phi022* и *phi027* и комплекса всех трех SSR-маркеров. Комбинация *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>163</sub> характерна только для образца амилозной кукурузы 517В ae1<sup>oh43</sup>. Сочетание аллелей *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>148</sub> отмечено только у образцов восковидной кукурузы (в гомозиготе у номеров 909D c1sh1wx1, АД96; в гетерозиготе – у АД117).

Самое распространенное в коллекции сочетание трех SSR-локусов – вариант *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>94</sub>. Однако существенных различий частот встречаемости этой комбинации аллелей в группах с контрастным содержанием амилопектина в крахмале не выявлено. Например, этот генотип отмечен у образцов восковидной кукурузы 915А wx1<sup>oh43</sup>, АД174, АД37, в гетерозиготе у образца АД42. Выявлены и уникальные для групп сочетания аллелей: *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>163</sub>*phi061*<sub>94</sub> (образец амилозной кукурузы 517В ae1<sup>oh43</sup>) и *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>148</sub>*phi061*<sub>94</sub> (образцы восковидной кукурузы 909D c1sh1wx1, АД96 и АД117). Кроме того, отмечены сочетания аллелей, с разной вероятностью встречающиеся в группах с диким и мутантным вариантами гена *waxy*. Так, варианты *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>86</sub> и *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>163</sub>*phi061*<sub>86</sub>



**Рис. 3.** Категоризированные гистограммы встречаемости сочетаний аллелей *phi022*, *phi027*, *phi061* в группах образцов, различающихся по содержанию амилопектина.

*а* – *phi022* и *phi061*; *б* – *phi027* и *phi061*; *в* – *phi022* и *phi027*; *з* – *phi022*, *phi027* и *phi061*.

широко распространены среди образцов сахарной кукурузы, однако были отмечены только у двух образцов восковидной кукурузы (АД42 и АД17).

### Заключение

В отсутствие информации о характере и причине мутации гена *waxy* использование внутригенных микросателлитных локусов – ценный инструмент для маркер-ассоциированной селекции восковидной кукурузы. В частности, L. Yang с коллегами (2013) использовали маркер *phi027* для пирамидирования генов *waxy* и *opaque-16*. По нашим данным, для маркер-ассоциированного отбора образцов восковидной кукурузы больший интерес представляют не отдельные аллели анализируемых SSR-локусов, а ассоциированные с целевым признаком комбинации аллелей.

На основании биохимического анализа в коллекции 33 образцов кукурузы были выделены две экспериментальные группы, контрастные по уровню накопления амилопектина в эндосперме: *Wx* – дикий тип, соответствующий

менее 85 % амилопектина от общего содержания крахмала в эндосперме, и мутантные по гену *wx* высокоамилопектиновые формы. Для ассоциированных с последовательностью гена *waxy* локусов *phi022*, *phi027*, *phi061* проведен анализ частот встречаемости аллельных вариантов маркера, их гомо/гетерозиготного состояния, а также комбинаций аллелей в двух-трех локусах. Вероятность соответствия комбинации трех локусов фенотипу «восковидная кукуруза» составила от 5 % (у носителей сочетания *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>94</sub>) до 100 % (у носителей уникального для восковидной кукурузы сочетания аллелей *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>148</sub>*phi061*<sub>94</sub>).

### Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (Санкт-Петербург, Россия) и центру Maize Genetics Cooperation Stock Center (Иллинойс, США) за предоставленный растительный материал.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

- ГОСТ 10845-98. Межгосударственный стандарт. Зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала. М.: ИПК Изд-во стандартов, 2001. [State Standard 10845-98. Interstate standard. Grain and Products of its Processing. Method for the Starch Determination. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov, 2001. (in Russian)]
- ГОСТ 5903-89. Межгосударственный стандарт. Изделия кондитерские. Методы определения сахара. М.: ИПК Изд-во стандартов, 2004. [State Standard 5903-89. Interstate standard. Methods for the Sugar Determination. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov, 2004. (in Russian)]
- Alexander D.E., Creech R.G. Breeding special and nutritional types. Corn and Corn Improvement. Ed. G.F. Sprague. Am. Soc. Agron, Madison, WI, 1977;363-390.
- Bao J.-D., Yao J.-Q., Zhu J.-Q., Hu W.-M., Cai D.-G., Li Y., Shu Q.-Y., Fan L.-J. Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of *waxy* gene. Mol. Breed. 2012;30(4): 1707. DOI 10.1007/s11032-012-9754-3.
- Bear R.P., Vineyard M.L., MacMasters M.M., Deatherage W.L. Development of "amylo maize" – corn hybrids with high amylose starch: II. Results of breeding efforts. Agron. J. 1958;50(10):598-602. DOI 10.2134/agronj1958.00021962005000100010x.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 1980;32(3):314-331.
- Cui L., Dong Sh., Zhang J., Liu P. Starch granule size distribution and morphogenesis in maize (*Zea mays* L.) grains with different endosperm types. Aust. J. Crop Sci. 2014;8(11):1560-1565.
- Dang N.-Ch. Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by doubled haploid and marker assisted selection techniques, doctoral thesis. Zurich. 2010. DOI org10.3929/ethz-a-006192803.
- Fan L.J., Bao J.D., Wang Y., Yao J.Q., Gui Y., Hu W., Zhu J., Zeng M., Li Y., Xu Y. Post-domestication selection in the maize starch pathway. PLoS One. 2009;4(10):e7612. DOI 10.1371/journal.pone.0007612.
- Hao D., Zhang Z., Cheng Y., Chen G., Lu H., Mao Y., Shi M., Huang X., Zhou G., Xue L. Identification of genetic differentiation between *waxy* and common maize by SNP genotyping. PLoS One. 2015;10(11):e0142585. DOI 10.1371/journal.pone.0142585.
- Hoverkamp-Hermelink J., Devries J., Adamse P., Jacobsen E., Witholt B., Feenstra W. Rapid estimation of the amylase amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. Potato Res. 1988;31:241-246.
- Huang B.-Q., Tian M.-L., Zhang J.-J., Huang Y.-B. *waxy* locus and its mutant types in maize *Zea mays* L. Agr. Sci. China. 2010;9(1):1-10. DOI 10.1016/S1671-2927(09)60061-4.
- Jobling S. Improving starch for food and industrial applications. Curr. Opin. Plant Biol. 2004;7(2):210-218. DOI 10.1016/j.pbi.2003.12.001.
- Klosgen R.B., Gierl A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H. Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. Mol. Gen. Genet. 1986; 203(2):237-244.
- Knutson C.A. A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. Cereal Chem. 1986;63:89-92.
- Lambert R.J. High-oil corn hybrids. Specialty Corns. Ed. A.R. Hallauer. FL: CRC Press, 2001;131-154.
- Lawrence C.J., Harper L.C., Schaeffer M.L., Sen T.Z., Seigfried T.E., Campbell D.A. MaizeGDB: the maize model organism database for basic, translational, and applied research. Int. J. Plant Genomics. 2008;496957. DOI 10.1155/2008/496957.
- Li W.C. Quality breeding. Maize Breeding in Southwestern Ecological Region. Eds. T.Z. Rong, W.C. Li, K.C. Yang, B. Zhang, S.K. Zhang, H.J. Tang, X.M. Fan. Beijing: China Agric. Press, 2003.
- Liu Y.-J., Huang Y.-B., Rong T.-Z., Tian M.-L., Yang J.-P. Comparative analysis of genetic diversity in landraces of waxy maize from Yunnan and Guizhou using SSR markers. Agr. Sci. China. 2005;4(9): 648-653.
- Nugent A.P. Health properties of resistant starch. Nutr. Bull. 2005; 30(1):27-54. DOI 10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x.
- Pan D. Starch synthesis in maize. Carbohydrate Reserves in Plants: Synthesis and Regulation. Eds. A.K. Gupta, N. Kaur. Amsterdam: Elsevier, 2000;26:125-146.
- Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 2006;6(1):288-295. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- Tan H.-Z., Li Z.-G., Tan B. Starch noodles: history, classification, materials, processing, structure, nutrition, quality evaluating and improving. Food Res. Int. 2009;42(5):551-576. DOI 10.1016/j.foodres.2009.02.015.
- Tian M.L., Huang Y.B., Tan G.X., Liu Y.J., Rong T.Z. Sequence polymorphism of *waxy* genes in landraces of waxy maize from southwest China. Acta Agron. Sin. 2008;34(5):729-736. DOI 10.3724/SP.J.1006.2008.00729.
- Wang Y.-J., White P., Pollak L., Jane J. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with *oh43* inbred line background. Cereal Chem. 1993;70(2):171-179.
- Wessler S., Vagaron R. Molecular basis of mutations at the *waxy* locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985;82(12):4177-4181.
- Wilson L.M., Whitt Sh.R., Ibáñez A.M., Rocheford T.R., Goodman M.M., Buckler E.S. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. Plant Cell. 2004;16(10):2719-2733. DOI 10.1105/tpc.104.025700.
- Yang L., Wang W., Yang W., Wang M. Marker-assisted selection for pyramiding the *waxy* and opaque-16 genes in maize using cross and backcross schemes. Mol. Breed. 2013;31(4):767-775. DOI 10.1007/s11032-012-9830-8.
- Yu R.H., Wang Y.L., Sun Y., Liu B. Analysis of genetic distance by SSR in waxy maize. Genet. Mol. Res. 2012;11(1):254-260. DOI http://dx.doi.org/10.4238/2012.February.3.5.
- Yu X., Yu H., Zhang J., Shao Sh., Xiong F., Wang Z. Endosperm structure and physicochemical properties of starches from normal, waxy, and super-sweet Maize. Int. J. Food Prop. 2015;18(12):2825-2839. DOI 10.1080/10942912.2015.1015732.
- Zheng H., Wang H., Yang H., Wu J., Shi B., Cai R. Genetic diversity and molecular evolution of Chinese waxy maize germplasm. PLoS One. 2013;8(6):e66606. pmid:23818949. DOI 10.1371/journal.pone.0066606.

## ORCID ID

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

# Анализ полиморфизма генома представителей синтетического вида *×Trititrigia cziczinii* Tsvet. методом AFLP

А.А. Трифонова<sup>1</sup>✉, К.В. Борис<sup>1</sup>, Л.В. Дедова<sup>1</sup>, В.А. Мельник<sup>1</sup>, Л.П. Иванова<sup>2</sup>, Н.П. Кузьмина<sup>2</sup>, С.В. Завгородний<sup>2</sup>, В.П. Упелниек<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, Россия

*×Trititrigia cziczinii* Tsvet. – синтетический вид, полученный в результате гибридизации различных видов пшеницы и пырея. *×T. cziczinii*, – обладает уникальными признаками: многолетность, способность к отрастанию после скашивания на зерно, высокая адаптивность, устойчивость к болезням и вредителям, высокое содержание белка и клейковины в зерне. Это позволяет считать его перспективной сельскохозяйственной культурой. Новый вид является удобным объектом для проведения фундаментальных исследований в области генетики, филогении и эволюции злаков (Poaceae). Однако прежде генетические исследования *×T. cziczinii* практически не проводились. Цель настоящей работы – изучение генетического разнообразия 24 представителей двух подвидов (*ssp. Submitans* и *ssp. Perenne*) вида *×T. cziczinii*. Для оценки межвидовых различий в анализ было включено 17 образцов других видов трибы Triticeae (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Agropyron glaucum* и *Agropyron elongatum*, а также образцы пшенично-пырейных и пшенично-элимусных гибридов (ППГ и ПЭГ)). В работе был применен метод маркирования AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), который позволил выявить достаточно высокий уровень полиморфизма изученных образцов. С помощью двух комбинаций праймер/фермент (*EcoRI*-*ACT*/*MseI*-*CCC* и *EcoRI*-*ACT*/*MseI*-*CTA*) удалось идентифицировать 227 фрагментов, из которых 224 были полиморфны (98.68 %), а уровень внутривидового полиморфизма 24 образцов *×T. cziczinii* составил 68.15 %. Найдены фрагменты AFLP-спектров, специфичные для представителей *×T. cziczinii* и изученных видов пырея, которые могут стать основой для создания маркеров, выявляющих интрогрессии генетического материала рода *Agropyron* в геноме представителей *×T. cziczinii*. Полученные результаты свидетельствуют о большей генетической близости *×T. cziczinii* к *T. aestivum*, чем к представителям рода *Agropyron*. Так, по данным кластерного анализа, представители *×T. cziczinii* и сорта мягкой пшеницы объединились в один подкластер, внутри которого образцы двух видов образуют отдельные группы. При этом в результате оценки внутривидового генетического разнообразия *×T. cziczinii* не было выявлено достоверной дифференциации представителей подвидов *Submitans* и *Perenne*, что, вероятно, связано с не до конца определенной генетической природой многолетности, основного признака, по которому эти подвиды разделены. Проведенное изучение части уникальной коллекции синтетического вида *×T. cziczinii* позволило получить первые данные о генетике вида, более ранние исследования затрагивали в основном фенотипические и хозяйственно ценные признаки. Применяемый в настоящем исследовании метод AFLP-маркирования показал высокую эффективность при работе с малоизученным видом, а его результаты перспективны и полезны для понимания генетической структуры нового вида (*×T. cziczinii* Tsvet.).

Ключевые слова: *×Trititrigia cziczinii* Tsvet.; синтетический вид; межвидовая гибридизация; AFLP-анализ; генетическое разнообразие.

## Genome polymorphism of the synthetic species *×Trititrigia cziczinii* Tsvet. inferred from AFLP analysis

А.А. Трифонова<sup>1</sup>✉, К.В. Борис<sup>1</sup>, Л.В. Дедова<sup>1</sup>, В.А. Мельник<sup>1</sup>, Л.П. Иванова<sup>2</sup>, Н.П. Кузьмина<sup>2</sup>, С.В. Завгородний<sup>2</sup>, В.П. Упелниек<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.V. Tsitsin Main Botanical Garden, RAS, Moscow, Russia

*×Trititrigia cziczinii* Tsvet. is a synthetic species obtained as a result of hybridization of different wheat and wheat-grass species. *×T. cziczinii* has unique characteristics, as it is a perennial species, with the ability to grow after mowing, high adaptability, resistance to diseases and pests, high protein and gluten content in the grain. All this makes it a promising new crop for agriculture. The new species is a good object for fundamental research in the field of genetics, phylogeny and evolution of cereals (Poaceae). However, there were practically no genetic studies of *×T. cziczinii*. The aim of this work was to study the genetic diversity of 24 representatives of two *×T. cziczinii* subspecies (*ssp. Submitans* and *ssp. Perenne*). To estimate interspecific differences, 17 samples of other tribe Triticeae species (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Agropyron glaucum* and *Agropyron elongatum*, as well as samples of *Triticum-Agropyron* and *Triticum-Elymus* hybrids) were included in the analysis. For the study, AFLP method (Amplified Fragment Length Polymorphism) was chosen, which allowed us to reveal a sufficiently high polymorphism level of the studied samples. The two primer/enzyme combinations (*EcoRI*-*ACT*/*MseI*-*CCC*, *EcoRI*-*ACT*/*MseI*-*CTA*) allowed the identification of 227 fragments, 224 of them were polymorphic (98.68 %), and the level of intraspecific polymorphism of 24 *×T. cziczinii* samples was 68.15 %. The identified fragments of AFLP spectra, specific for the *×T. cziczinii* representatives and the studied wheat-grass species, can be the basis for creating markers that will detect introgressions of genetic material of the genus *Agropyron* in the *T. cziczinii* genome. Our results indicate a greater genetic relatedness of *×T. cziczinii* to *T. aestivum* than to representatives of the genus *Agropyron*. According to the cluster analysis, representatives of *×T. cziczinii* and varieties of bread wheat were combined into a single subcluster, within which the samples of two species form separate groups. At the same time, the evaluation of the intraspecific genetic diversity of *×T. cziczinii* showed

no reliable differentiation of representatives of the subspecies *Submitans* and *Perenne*, which is probably due to uncertain genetic nature of perenniality, the main feature that divides these subspecies. The study of the unique  $\times T. cziczinii$  collection allowed us to obtain the first data on the genetics of the species, while previous studies were focused mainly on phenotypic and economically valuable traits. AFLP analysis used in this study showed high efficiency when working with less studied species, and its results are promising and useful for understanding the genetic structure of the new species ( $\times T. cziczinii$  Tsel.).

Key words:  $\times Triticigia cziczinii$  Tsel.; synthetic species; interspecific hybridization; AFLP-analysis; genetic diversity.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Трифонова А.А., Борис К.В., Дедова Л.В., Мельник В.А., Иванова Л.П., Кузьмина Н.П., Завгородний С.В., Упельник В.П. Анализ полиморфизма генома представителей синтетического вида  $\times Triticigia cziczinii$  Tsel. методом AFLP. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):648-653. DOI 10.18699/VJ18.406

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Trifonova A.A., Boris K.V., Dedova L.V., Melnik V.A., Ivanova L.P., Kuzmina N.P., Zavgorodny S.V., Upelniek V.P. Genome polymorphism of the synthetic species  $\times Triticigia cziczinii$  Tsel. inferred from AFLP analysis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):648-653. DOI 10.18699/VJ18.406 (in Russian)

Отдаленная гибридизация открывает широкие возможности для использования геномного потенциала диких видов растений. Так, представители видов пырея являются донорами генов устойчивости к ряду заболеваний, адаптивности и качества и, соответственно, могут быть использованы в селекционных программах по улучшению культурных видов злаков. Поэтому отдаленные гибриды, полученные от скрещивания культурных и диких видов, могут стать не только хорошим объектом для фундаментальных исследований, но и перспективными формами для селекции и сельскохозяйственного производства.

Генетическое разнообразие отдаленных гибридов, в частности синтетических (рукотворных), полученных с помощью межродовой гибридизации, изучается недостаточно активно, хотя подобные исследования позволяют получать данные о механизмах межгеномных взаимодействий в процессе образования новых таксонов при гибридизации, расширить знания в области сетчатой эволюции злаков – одного из способов объяснения главных эволюционных путей в трибе Triticeae.

$\times Triticigia cziczinii$  Tsel. – синтетический вид, полученный под руководством академика Н.В. Цицина методом отдаленной гибридизации и выделенный в отдельный род *Triticigia* Н.Н. Цвелевым (1973). В качестве родительских форм использовали виды пырея (*Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv. (syn. *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Zhi W. Liu & R.R.-C. Wang) и *A. glaucum* (Desf. ex DC) Roem. and Schult. (syn. *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey)) и сорта мягкой и твердой пшеницы (*Triticum aestivum* L. и *T. durum* Desf.) в различных комбинациях. Описывая новый синтетический вид, отличительной особенностью которого является то, что после созревания и уборки зерна развиваются побеги возобновления, т. е. происходит отрастание новых побегов, которые способны образовывать колос, Н.В. Цицин (1960) выделил два подвида: ssp. *Submitans* (отрастающая форма) и ssp. *Perenne* (многолетняя форма). Геном  $\times T. cziczinii$  представлен 56 хромосомами, из которых 42 пшеничные и 14 пырей-

ные (Любимова и др., 1976). Кроме того, растения этого вида обладают устойчивостью к болезням и вредителям, высокой адаптивностью.

С 1960 г. коллекция образцов  $\times T. cziczinii$  поддерживается в отделе отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН; сотрудниками проводятся многолетние наблюдения и исследования этого вида, отбираются новые перспективные формы. Но только в последние годы начаты работы по использованию молекулярно-генетических маркеров для оценки генетического разнообразия коллекции. В 2012 г. впервые исследован полиморфизм запасных белков (глиадинов)  $\times T. cziczinii$  (Упельник и др., 2012). Однако анализ генетического разнообразия вида  $\times T. cziczinii$  с помощью ДНК-маркеров ранее не проводился.

Одним из эффективных методов изучения генетического разнообразия растений является AFLP-анализ (Amplified Fragment Length Polymorphism). Он широко используется для изучения популяционного полиморфизма, филогенетических отношений, идентификации видов, а также маркирования локусов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками (Alinkut et al., 2003; El Rabey et al., 2014; Kaaya et al., 2014; Xue, Chu, 2015). Этот метод довольно часто применяется и для исследования геномов злаков, причем как культурных (El Rabey et al., 2014; Садыгов и др., 2017), так и дикорастущих (Kaaya et al., 2014; Горюнова и др., 2017) видов.

Целью настоящей работы было изучение внутривидового генетического разнообразия представителей двух подвидов синтетического вида  $\times Triticigia cziczinii$  Tsel., а также межвидового разнообразия представителей дикорастущих и культурных форм злаков, использованных при создании этого вида, методом AFLP-анализа.

#### Материалы и методы

Исследовано восемь образцов подвида ssp. *Submitans* (однолетние, отрастающие) – линии № 12, 38, 40, 80, 166, 192, 1689, 3305 и 15 образцов подвида ssp. *Perenne* (многолетние) – линии № 24, 33, 249, 249-1, 548, 1416,

1451, 1514, 1533, 1797, 1682, 3202, 4015, 209, 3П26. Разделение по признаку многолетности происходит в зависимости от числа перезимовавших растений и может зависеть от условий зимовки. Поэтому линии подвида *Perenne* могут в определенные годы развиваться как однолетние, отрастающие. Лишь линии 24, 249, 249-1 можно считать облигатно многолетними (по данным длительных наблюдений).

Кроме того, в анализ было включено шесть образцов двух видов пырея (три образца *A. glaucum* и три – *A. elongatum*), четыре образца мягкой пшеницы *T. aestivum* (сорта Chinese Spring, Мироновская 808, Московская 39 и Заря), один образец твердой пшеницы *T. durum* (сорт Харьковская 21), четыре линии пшенично-пырейных гибридов (ППГ-254, ППГ-260, ППГ-283, ППГ-284), два сорта ППГ (Оста, Снегиревская 10) и один сорт пшенично-элимусного гибрида – ПЭГ (Рубежная).

Образцы родов ×*Triticigia* и *Agropyron*, а также пшенично-пырейные и элимусные гибриды получены из коллекции Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Сорта мягкой и твердой пшеницы взяты из коллекции Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен РАН).

ДНК образцов рода *Agropyron* и вида ×*T. cziczinii* выделяли из свежих листьев, а образцов рода *Triticum*, ППГ и ПЭГ – из пятидневных проростков стандартным СТАВ-методом с модификациями (Doyle, 1991). AFLP-анализ проводили стандартным методом (Vos et al., 1995). Для первого раунда амплификации была использована следующая комбинация праймер/фермент: *EcoRI*-A и *MseI*-C. Для второго раунда амплификации по литературным данным (Садыгов и др., 2017) были отобраны две комбинации: *EcoRI* – АСТ/*MseI*-ССС и *EcoRI*-АСТ/*MseI*-СТА. Фракционирование продуктов амплификации осуществляли путем электрофореза в 6 % полиакриламидном геле (ПААГ) в 1×кратном ТВЕ-буфере. Окрашивание проводили нитратом серебра, проявляли гель по методу № 3 (Benbouza et al., 2006). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (0.05 г/л).

Результаты AFLP-анализа суммировали в виде бинарной матрицы (1/0) в программе Microsoft Excel. Анализ методом главных координат (PCA), а также построение дендрограммы выполняли в программе PAST 3.16 (Hammer et al., 2001) на основе индекса генетического сходства Дайса, который исключает из рассмотрения совместное отсутствие фрагмента (так как существует возможность того, что нулевые аллели не гомологичны), и в некоторых исследованиях показаны преимущества его использования (Duarte et al., 1999). Кластерный анализ выполнен с использованием метода UPGMA, оценку достоверности проводили с помощью бутстреп-анализа с 1000 реплик.

## Результаты

В ходе AFLP-анализа 41 образца трибы Triticeae выявлено 227 фрагментов (137 для праймера *EcoRI* – АСТ/*MseI*-ССС и 90 для праймера *EcoRI*-АСТ/*MseI*-СТА), из которых 224 были полиморфны (98.68 %).

Средний показатель коэффициента генетического сходства между всеми образцами составил 0.668. Наиболее

генетически близкими оказались образцы ППГ-254 и сорт ПЭГ Рубежная (0.982). Наименьший уровень генетического сходства отмечен для образцов *A. elongatum* и сорта ПЭГ Рубежная (0.087).

На основании рассчитанных индексов сходства проведен кластерный анализ (рис. 1).

Как видно из рис. 1, на дендрограмме четко выделяются два кластера с высоким значением бутстреп-поддержки (индекс бутстрепа (ИБ) = 100). Представители рода *Agropyron* образуют первый кластер, который в свою очередь делится на два подкластера, соответствующих видам *A. glaucum* и *A. elongatum*.

Все остальные образцы объединяются во второй кластер. Обособленное положение (ИБ = 100) в этом кластере занимает образец твердой пшеницы сорта Харьковская 21. Отдельный подкластер во втором кластере образуют линии и сорта ППГ (ППГ-254, ППГ-260, ППГ-283, ППГ-284, Оста, Снегиревская 10) и сорт ПЭГ (Рубежная). Представители ×*T. cziczinii* и сорта мягкой пшеницы объединились в еще один подкластер, внутри которого образцы двух видов дифференцированы, пусть и с небольшим значением индекса бутстрепа (ИБ = 58).

Спектры фрагментов представителей ×*T. cziczinii* были более сходны со спектрами *T. aestivum*, чем со спектрами *A. glaucum* и *A. elongatum*. Детектировано 10 фрагментов, присутствующих только у представителей рода *Agropyron*, и 24 фрагмента, присутствующих только у *T. aestivum* и представителей двух подвигов ×*Triticigia*. Но найдены также фрагменты, специфичные для *A. glaucum*, *A. elongatum* и представителей ×*T. cziczinii*. Было детектировано три фрагмента, амплифицирующихся только у образцов рода *Agropyron* и у всех представителей ssp. *Submitans* и ssp. *Perenne*, а также один фрагмент, который амплифицировался у образцов *T. aestivum*, а в спектрах *A. glaucum*, *A. elongatum* и ×*T. cziczinii* отсутствовал.

В ходе работы была проведена оценка внутривидового полиморфизма ×*T. cziczinii*. Уровень полиморфизма изучаемых образцов ×*T. cziczinii* составил 68.15 %. При этом у представителей подвида *Submitans* уровень полиморфизма был ниже, чем у представителей подвида *Perenne* (52.08 и 61.07 % соответственно), что может быть объяснено меньшим числом образцов этого подвида, доступных для анализа.

Коэффициент генетического сходства Дайса между образцами ×*T. cziczinii* оказался достаточно высоким (среднее значение 0.855), он варьировал от 0.755 до 0.974. Максимальный уровень сходства между образцами подвида *Perenne* составил 0.974 (образцы 4015 и 209), минимальный уровень сходства отмечен между образцами 24 и 3202 (0.755). Среди образцов подвида *Submitans* этот показатель варьировал от 0.784 (между образцами 38 и 3305) до 0.961 (между образцами 40 и 80).

На основании значений индексов генетического сходства выполнен анализ методом главных координат, отражающий различия между изучаемыми образцами ×*T. cziczinii* (рис. 2). Как видно из приведенного графика, а также на дендрограмме, нет четкого разделения между образцами двух подвигов. Это подтверждается также отсутствием фрагментов, специфичных для AFLP-спектра определенного подвида. Достаточно обособлены образцы подвида

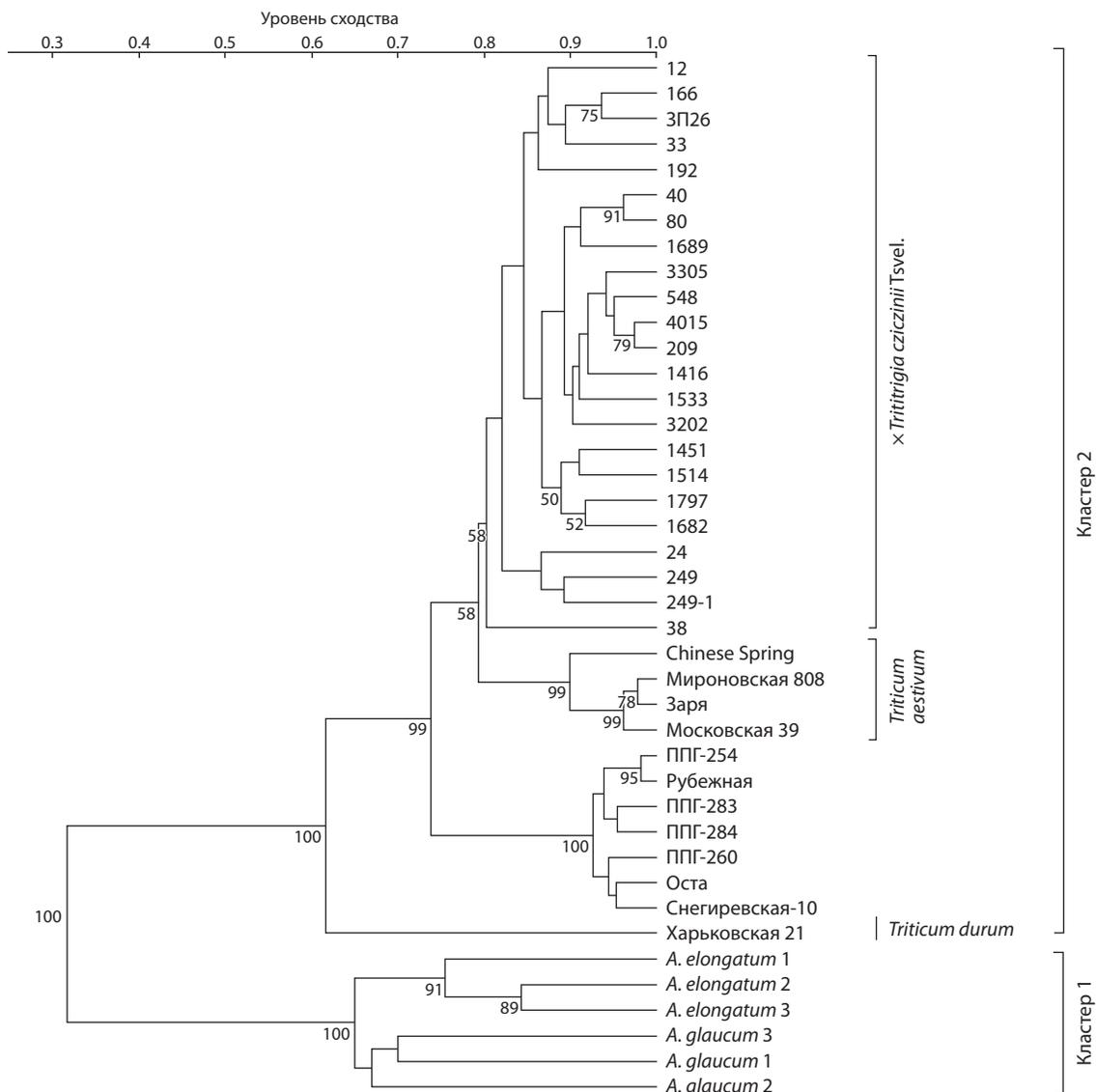


Рис. 1. Кластеризация всех изученных образцов, выполненная по результатам AFLP-анализа.

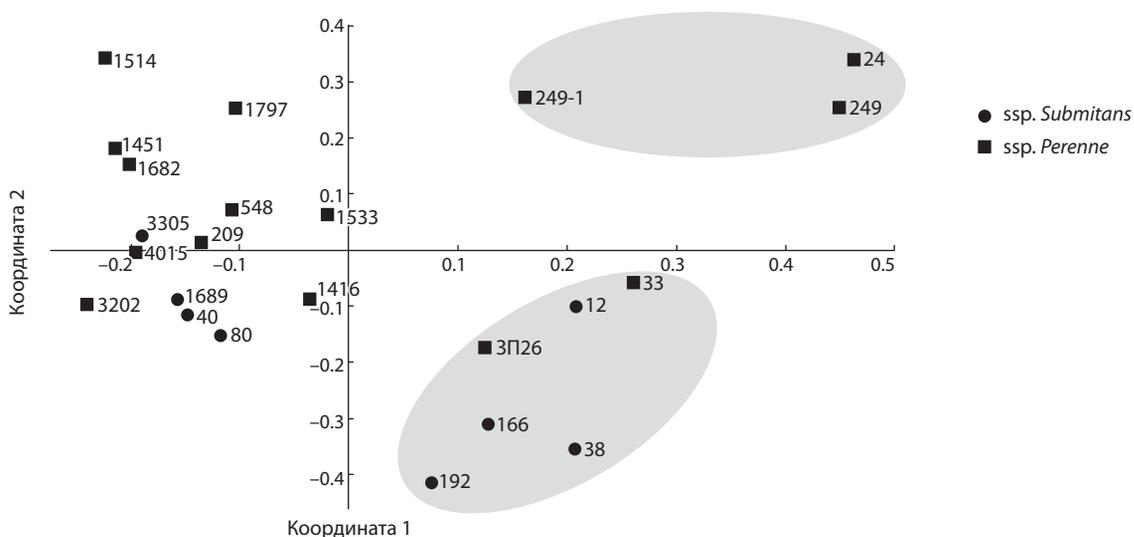


Рис. 2. Дифференциация изучаемых образцов вида *xT. cziczinii* Tsvet., выявленная по результатам AFLP-анализа, с использованием метода главных координат.

*Perenne*: 24, 249, 249-1. Отдельную группу формируют также образцы 12, 33, 38, 166, 192 и ЗП26.

## Обсуждение

Метод AFLP-маркирования достаточно широко используется для анализа генетического разнообразия трибы Triticeae (Khalighi et al., 2008; Colomba et al., 2011; Jensen et al., 2016; Горюнова и др., 2017; Садыгов и др., 2017). В настоящем исследовании этот метод был впервые применен для анализа генетического разнообразия синтетического вида *×T. cziczinii* Tsvet. и позволил выявить и оценить как внутривидовой полиморфизм, так и межвидовые различия. Были использованы две праймерные комбинации, ранее успешно примененные для оценки генетического разнообразия твердой пшеницы (Садыгов и др., 2017). Выбранные комбинации праймер/фермент оказались эффективны и для анализируемой выборки (всего получено 227 фрагментов), а уровень межвидового полиморфизма был достаточно высок и составил 98.68 %.

Уровень разнообразия внутри вида *×T. cziczinii* был меньше (68.15 %). Однако, по сравнению с другими исследованиями внутривидового разнообразия представителей рода *Triticum*, его можно считать высоким. Так, при исследовании внутривидового полиморфизма разных видов пшеницы с помощью AFLP-маркирования уровень полиморфизма не превышал 64 % (Khan et al., 2014). Уровень генетического разнообразия, выявленный в ходе AFLP-анализа 54 образцов синтетической гексаплоидной пшеницы, полученной путем скрещивания *T. dicoccum* и *A. tauschii*, составил 39 %, что, как отмечают авторы (Lage et al., 2003), выше, чем у обычно наблюдаемого для культивируемых гексаплоидных пшениц уровня полиморфизма (12–21 %).

В AFLP-спектрах образцов *×T. cziczinii* преобладают компоненты пшеницы. В результате кластерного анализа полученных результатов установлено, что вид *×T. cziczinii* является промежуточной формой и генетически ближе к роду *Triticum*, чем к роду *Agropyron* (см. рис. 1). Близость вида *×T. cziczinii* к представителям рода *Triticum* подтверждается также данными, полученными в результате анализа электрофоретических спектров глинаина. Спектры глинаина *×T. cziczinii* типичны для представителей рода *Triticum*, в них присутствовали также и отдельные компоненты проламинов пырея (Упельник и др., 2012). Такая дифференциация вполне объяснима, ведь при получении *×T. cziczinii* применялись сложные схемы скрещиваний, в том числе возвратные скрещивания с пшеницей, для элиминации нежелательных признаков пырея.

Идентифицированные в настоящем исследовании фрагменты, специфичные для представителей *×T. cziczinii* и изучаемых видов пырея, могут стать основой для создания маркеров, которые будут выявлять интрогрессии генетического материала рода *Agropyron* в геноме представителей *×T. cziczinii*. Это может быть использовано в селекционной работе для отслеживания передачи генетического материала пырея и последующей защиты и идентификации сортов/генотипов синтетического вида.

Поиск маркеров, позволяющих выявлять интрогрессии генетического материала в гибридных видах, был ранее проведен П.Ю. Крупиным с коллегами (2011). В своей

работе они идентифицировали специфичные аллельные варианты для видов рода *Agropyron* и сорта пшенично-пырейного гибрида Истра 1 по шести микросателлитным локусам, отсутствующим у пшеницы. Однако следует заметить, что в это исследование был включен всего один образец ППГ, а размер аллелей микросателлитных локусов (п. н.) пшеницы, использованной авторами для сравнения, был взят из литературных данных.

Образцы ППГ формируют на дендрограмме отдельную группу (см. рис. 1), что, по всей видимости, связано с тем, что у этих гибридов в геноме встречаются отличные от *×T. cziczinii* комбинации хромосом от родительских форм. Однако средний коэффициент сходства между образцами ППГ и образцами мягкой пшеницы сопоставим с таковым между представителями *×T. cziczinii* и образцами мягкой пшеницы (0.790 и 0.794 соответственно). Интересно, что вместе с образцами ППГ кластеризуется и образец ПЭГ (сорт Рубежная), возможно, из-за похожего набора родительских форм пшеницы, использованных для их создания, а также из-за сходства геномов элимуса и пырея.

В результате проведенной оценки внутривидового генетического разнообразия *×T. cziczinii* не было выявлено достоверной дифференциации представителей подвидов *Submitans* и *Perenne* (см. рис. 2). Кроме того, коэффициент генетического сходства между всеми изучаемыми образцами *×T. cziczinii* совпадает со значениями этого показателя, выявленными для образцов внутри каждого подвида. Отметим обособленное положение на графике главных координат (см. рис. 2) образцов 24, 249, 249-1, которые по описанию являются облигатно многолетними формами (см. Материалы и методы). Вероятно, именно эти образцы должны быть отнесены к ssp. *Perenne*. Однолетние отрастающие и многолетние образцы 12, 33, 38, 166, 192 и ЗП26 располагаются на графике главных координат отдельно от основной группы образцов, состоящей из линий, которые по определенным ботаническим характеристикам, выделенным еще Н.В. Цициным, относятся к разным подвидам (см. рис. 2). Возможным объяснением полученного результата можно считать не окончательно выявленную природу основного признака, по которому эти подвиды разделены, – многолетность. Необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на уточнение ботанических, а также генетических параметров, разделяющих изучаемые подвиды.

Таким образом, впервые проведен AFLP-анализ представителей двух подвидов вида *×T. cziczinii* Tsvet. (ssp. *Submitans* и ssp. *Perenne*). Примененные комбинации праймеров позволили выявить и оценить уровень внутривидового полиморфизма ранее не изучавшегося синтетического вида, а также генетические различия с видами рода *Triticum* и *Agropyron*. Определено, что, исходя из структуры генома изучаемого вида, вид *×T. cziczinii* генетически более близок к роду *Triticum*, чем к роду *Agropyron*, что вполне закономерно. Показан низкий уровень дифференциации между представителями двух подвидов. Найдены фрагменты, специфичные для образцов рода *Agropyron* и *×T. cziczinii*. Идентифицированные фрагменты могут стать основой для создания маркеров, которые будут выявлять интрогрессии генетического материала *Agropyron* в геноме представителей *×T. cziczinii*.

## Благодарности

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН № 41 «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России» (тема № 0112-2018-0023) и Государственного задания ГБС РАН № 118021490111-5.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

- Горюнова С.В., Чикида Н.Н., Кочиева Е.З. AFLP, RAPD и ISSR анализы внутривидовой изменчивости и межвидовых различий аллотетраплоидных видов *Aegilops kotschy* Boiss. и *Aegilops variabilis* Eig. Генетика. 2017;53(5):570-578. DOI 10.7868/S0016675817050058. [Goryunova S.V., Chikida N.N., Kochieva E.Z. AFLP, RAPD, and ISSR analysis of intraspecific polymorphism and interspecific differences of allotetraploid species *Aegilops kotschy* Boiss. and *Aegilops variabilis* Eig. Russ. J. Genetics (Moscow). 2017;53(5):568-575. DOI 10.1134/S1022795417050040.]
- Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Адаптация микросателлитных SSR-маркеров пшеницы для анализа геномов пырея среднего и пырея удлиненного и пшенично-пырейных гибридов. Изв. ТСХА. 2011;3:49-57. [Krupin P.Yu., Divashuk M.G., Fesenko I.A., Karlov G.I. Adaptation of wheat microsatellite SSR-markers for the genome analysis of intermediate wheatgrass, tall wheatgrass, and wheat-wheatgrass hybrids. Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy. 2011;3:49-57. (in Russian)]
- Любимова В.Ф., Мясникова А.П., Белов В.И. Цитогенетическое исследование форм многолетней пшеницы. Генетика и селекция отдаленных гибридов. М.: Наука, 1976. [Lyubimova V.F., Myasnikova A.P., Belov V.I. Cytogenetic study of the perennial wheat forms. Genetics and Breeding of Distant Hybrids. Moscow: Nauka Publ., 1976. (in Russian)]
- Садыгов Г.Б., Трифонова А.А., Кудрявцев А.М. Генетическое разнообразие коллекции сортов и разновидностей *Triticum durum* Desf. из Азербайджана. Генетика. 2017;53(5):579-590. DOI 10.7868/S0016675817050095. [Sadigov G.B., Trifonova A.A., Kudryavtsev A.M. Genetic diversity in collection of cultivars and varieties of *Triticum durum* Desf. from Azerbaijan. Russ. J. Genetics (Moscow). 2017;53(5):576-586. DOI 10.1134/S1022795417050088.]
- Упельник В.П., Белов В.И., Иванова Л.П., Долгова С.П., Демидов А.С. Наследие академика Н.В. Цицина – современное состояние и перспективы использования коллекции промежуточных пшенично-пырейных гибридов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(3):667-674. [Upelniek V.P., Belov V.I., Ivanova L.P., Dolgova S.P., Demidov A.S. Heritage of academician N.V. Tsitsin: state-of-the-art and potential of the collection of intermediate wheat × couch-grass hybrids. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(3):667-674. (in Russian)]
- Цвелев Н.Н. Обзор видов трибы *Triticeae* Dum. семейства злаков (Poaceae) во флоре СССР. Новости систематики высших растений. 1973;10:19-59. [Tsvelev N.N. Conspectus specierum tribus *Triticeae* Dum. familiae Poaceae in flora USSR. Novosti Systematiki Vysshikh Rasteniy = News in Higher Plant Taxonomy. 1973;10:19-59. (in Russian)]
- Цицин Н.В. Новый вид и новые разновидности пшеницы. Бюл. Гл. бот. сада. 1960;38:38-41. [Tsitsin N.V. New species and new varieties of wheat. Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the Central Botanical Garden. 1960;38:38-41. (in Russian)]
- Altinkut A., Kazan K., Gozukirmizi N. AFLP marker linked to water-stress-tolerant bulks in barley (*Hordeum vulgare* L.). Genet. Mol. Biol. 2003;26(1):77-82. DOI 10.1590/S1415-47572003000100013.
- Benbouza H., Jacquemin J., Baudoin J., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2006;10(2):77-81.
- Colomba M.S., Gregorini A. Genetic diversity analysis of the durum wheat Graziella Ra, *Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn. (Poales, Poaceae). Biodivers. J. 2011;2:73-84.
- Doyle J. DNA protocols for plants. Molecular Techniques in Taxonomy NATO ASI Series. 1991;57:283-293.
- Duarte J.M., Santos J.B.D., Melo L.C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. Genet. Mol. Biol. 1999;22(3):427-432. DOI 10.1590/S1415-47571999000300024.
- El Rabey H.A., Al-Malki A.L., Abulnaja K.O., Ebrahim M.K., Kumosani T., Khan J.A. Phylogeny of ten species of the genus *Hordeum* L. as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis. Mol. Biol. Rep. 2014;41(1):365-372. DOI 10.1007/s11033-013-2870-2.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Electronica. 2001;4(1):1-9.
- Jensen K.B., Yan X., Larson S.R., Wang R.R.C., Robins J.G. Agronomic and genetic diversity in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). Plant Breed. 2016;135(6):751-758. DOI 10.1111/pbr.12420.
- Kaya H.B., Demirci M., Tanyolac B. Genetic structure and diversity analysis revealed by AFLP on different *Echinochloa* spp. from northwest Turkey. Plant Syst. Evol. 2014;300(6):1337-1347. DOI 10.1007/s00606-013-0965-9.
- Khalighi M., Arzani A., Poursiahbidi M.A. Assessment of genetic diversity in *Triticum* spp. and *Aegilops* spp. using AFLP markers. Afr. J. Biotechnol. 2008;7(5):546-552.
- Khan M.K., Pandey A., Choudhary S., Hakki E.E., Akkaya M.S., Thomas G. From RFLP to DArT: molecular tools for wheat (*Triticum* spp.) diversity analysis. Genet. Resour. Crop Evol. 2014;61(5):1001-1032. DOI 10.1007/s10722-014-0114-5.
- Lage J., Warburton M.L., Crossa J., Skovmand B., Andersen S.B. Assessment of genetic diversity in synthetic hexaploid wheats and their *Triticum dicoccum* and *Aegilops tauschii* parents using AFLPs and agronomic traits. Euphytica. 2003;134(3):305-317.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1995;23(21):4407-4414.
- Xue Y., Chu L. A rapid identification of barley varieties using DNA-AFLP. J. Institute of Brewing. 2015;121(4):496-501. DOI 10.1002/jib.253.

## ORCID ID

- A.A. Trifonova orcid.org/0000-0001-9618-5932  
K.V. Boris orcid.org/0000-0002-8479-4949  
L.V. Dedova orcid.org/0000-0003-1531-8938  
V.A. Melnik orcid.org/0000-0001-8677-4354  
L.P. Ivanova orcid.org/0000-0002-3466-7263  
N.P. Kuzmina orcid.org/0000-0002-2266-4348  
S.V. Zavgorodny orcid.org/0000-0001-8264-4499  
V.P. Upelniek orcid.org/0000-0002-6055-8861

# Assessment of genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) by newly developed multiplex panels of nuclear SSR loci

T.A. Poliakova , A.V. Shatokhina, G.N. Bondarenko, D.V. Politov

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Taxonomic and population genetic studies of the genus *Spiraea* (Rosaceae) species require new informative genetic markers. We screened 37 previously published heterologous oligonucleotide primer pairs for nuclear microsatellite loci and selected eight polymorphic and most reproducible of them for PCR multiplexing which substantially increases performance of routine mass genotyping. Three multiplex sets of 3, 3 and 2 loci, respectively, were developed and tested for ability to estimate the parameters of genetic variability and population structure in closely related species *Spiraea ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedryfolia* representing seven natural populations of the Russian Far East and Siberia. Allele number ranged among loci from twelve (*Spth20*) to three. Among 41 alleles found, 7 were unique in some species/populations. Analysis of parameters of genetic variability in *Spiraea* spp. showed similar values of allele number per locus and observed heterozygosity among populations and slightly greater estimates of expected heterozygosity in the samples of *S. flexuosa* ( $N_A = 2.387$ ;  $H_O = 0.387 \pm 0.052$ ;  $H_E = 0.540 \pm 0.055$ ) as compared to *S. ussuriensis* ( $N_A = 2.781$ ;  $H_O = 0.385 \pm 0.079$ ;  $H_E = 0.453 \pm 0.072$ ) and *S. chamaedryfolia* ( $N_A = 2.875$ ;  $H_O = 0.331 \pm 0.071$ ;  $H_E = 0.505 \pm 0.069$ ). The observed values of genetic polymorphism parameters indicate the average level of genetic diversity of the studied species typical to previous studies in *Spiraea*. About 19 % of the observed variability occurred among populations ( $F_{ST} = 0.191$ ) while 81 % of the total genetic variation concentrated within the populations. The loci *VS11*, *VS12*, *VS2*, and *VS6* contributed most to the observed differentiation. Nei genetic distances between populations ranged from 0.049 to 0.585. Genetic differentiation patterns among studied populations based on allele frequencies of nuclear microsatellite loci correspond with their geographical location. Genetic composition of some samples contradicted with their provisional species identification.

**Key words:** *Spiraea ussuriensis*; *Spiraea flexuosa*; *Spiraea chamaedryfolia*; nuclear microsatellite loci; SSR; multiplex panels; genetic variability; population structure.

## Оценка генетического разнообразия некоторых сибирских и дальневосточных видов рода *Spiraea* (Rosaceae) на основе разработанных мультиплексных панелей из ядерных микросателлитных локусов

Т.А. Полякова , А.В. Шатохина, Г.Н. Бондаренко, Д.В. Политов

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

Для таксономических и популяционно-генетических исследований видов рода *Spiraea* (Rosaceae) требуются новые информативные генетические маркеры. Мы протестировали 37 ранее опубликованных гетерологичных пар олигонуклеотидных праймеров для ядерных микросателлитных локусов и отобрали 8, дающих полиморфные продукты амплификации и наиболее воспроизводимых для ПЦР-мультиплексирования, что существенно повышает эффективность рутинного массового генотипирования. Разработаны и апробированы три мультиплексных панели из трех, трех и двух локусов соответственно для оценки параметров генетической изменчивости и структуры популяции у близкородственных видов *Spiraea ussuriensis*, *S. flexuosa* и *S. chamaedryfolia* из семи природных популяций Дальнего Востока и Сибири. Число аллелей варьировало между локусами от двенадцати (в локусе *Spth20*) до трех. У некоторых видов/популяций из 41 выявленного аллеля 7 были уникальными. Анализ параметров генетической изменчивости в *Spiraea* spp. показывает схожие значения числа аллелей на локус и наблюдаемой гетерозиготности между популяциями и немного более высокий уровень ожидаемой гетерозиготности в выборках *S. flexuosa* ( $N_A = 2.387$ ;  $H_O = 0.387 \pm 0.052$ ;  $H_E = 0.540 \pm 0.055$ ) по сравнению с *S. ussuriensis* ( $N_A = 2.781$ ;  $H_O = 0.385 \pm 0.079$ ;  $H_E = 0.453 \pm 0.072$ ) и *S. chamaedryfolia* ( $N_A = 2.875$ ;  $H_O = 0.331 \pm 0.071$ ;  $H_E = 0.505 \pm 0.069$ ). Выявленные значения параметров генетического полиморфизма свидетельствуют о среднем уровне генетического разнообразия изучаемых видов, характерном для ранее проведенных исследований в роде *Spiraea*. Около 19 % всей изучаемой изменчивости приходится на межпопуляционную ( $F_{ST} = 0.191$ ), в то время как 81 % общей генетической изменчивости сосредоточен в популяциях. Наибольший вклад в исследуемую дифференциацию вносят локусы *VS11*, *VS12*, *VS2*, *VS6*. Генетические расстояния Nei между популяциями варьировали от 0.049 до 0.585.

Генетическая дифференциация исследуемых популяций, основанная на частотах аллелей ядерных микросателлитных локусов, соответствует географическому положению выборок. У некоторых образцов отмечается противоречие между аллельным разнообразием и их предварительной морфологической идентификацией.

Ключевые слова: *Spiraea ussuriensis*; *Spiraea flexuosa*; *Spiraea chamaedryfolia*; ядерные микросателлитные локусы; SSR; мультиплексные панели; генетическая изменчивость; популяционная структура.

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Poliakova T.A., Shatokhina A.V., Bondarenko G.N., Politov D.V. Assessment of genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) by newly developed multiplex panels of nuclear SSR loci. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):654-659. DOI 10.18699/VJ18.407

The study of biological diversity is one of the most important scientific directions in plant genetics. The nuclear microsatellite loci are highly variable codominant molecular markers widely used in population genetic studies, genetic identification of individual genotypes and clones, parentage analysis, and confirmation of the hybridity. The development of multiplex panels consisting of nuclear microsatellite loci is relevant for the genus *Spiraea* due to the complexity in the taxonomic identification of samples, the phenomenon of hybridization and polyploidy, and the clonal nature of the distribution of some species, so the fragment analysis based on the developed multiplex sets can substantially simplify the workflow.

The *Spiraea* species grow in temperate and boreal zones of the Northern Hemisphere. The southern border of the genus range in Asia passes through the Eastern and Northern Himalayas, in America the southern border crosses the Central part of Mexico. The genus *Spiraea* includes more than 100 taxa in the world flora and about 25 taxa in Russia.

There are few researches devoted to the analysis of population-genetic structure of species of *Spiraea* genus, and they are mainly associated with the development of primers for microsatellite analysis of specific species (Brzyski, 2010; Ashizawa et al., 2012; Khan et al., 2014). However, there are no publications on PCR multiplexing and development of multiplex assays for genotyping of *Spiraea* species. The population genetic studies in such species as *Spiraea ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedryfolia* have been conducted for the first time.

The goal of this research was to assess the genetic diversity of some Siberian and Far Eastern species of the genus *Spiraea* by newly developed multiplex panels of nuclear microsatellite markers able to raise efficiency and optimize population genetic studies, species and clone identification in the *Spiraea* taxa.

## Materials and methods

The present study was carried out on 115 samples of *Spiraea* spp. collected by us in seven native stands located in Siberia and the Far East of Russia. While collecting samples, the ability of *Spiraea* to develop clonal offsprings was taken into account. The geographical location, code and sample size for the studied sites are listed below: *S. ussuriensis* – Ussuriysk (uss), Primorsky Krai, Ussuri district, 15 specimens; Ol'ga (olg), Primorsky Krai, Ol'ginsky district, 8 specimens; Gornovodnoye (gorn), Primorsky Krai, Ol'ginsky district, 18 specimens; Zeya (zey), Amurskaya oblast, Zeyskii district,

19 specimens; *S. flexuosa* – Shkotovo (shkt), Primorsky Krai, Shkotovsky district, 23 specimens; Buryat (ul), Buryatia, near Ulan-Ude city, 15 specimens; *S. chamaedryfolia* – Turochak (tur), Altayskiy Krai, Turochakskiy district, 17 specimens.

Total DNA was isolated from herbarium specimens by both the standard CTAB method (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990) and the commercial kits for isolation of genomic DNA from plants – GeneJET Mini (Fermentas) and DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), MagMAX DNA Multi-Sample Kit (Invitrogen). The concentration and amount of DNA were measured in 0.8 % agarose gel and spectrophotometrically (NanoPhotometer P-Class P-360, Implen).

First of all, we carried out screening of primers designed for different species of *Spiraea* (Brzyski, 2010; Ashizawa et al., 2012; Khan et al., 2014). All 37 primer pairs previously published were selected for pre-screening. Each primer pair was first tested in a separate PCR following the original protocols. Loci that showed stable amplification were further combined into groups of three or two in order to develop PCR multiplex assays. If it was possible, primers with identical annealing temperature were combined into one set.

From the selected eight pre-screened loci three multiplex assays, each of them amplifying three or two loci, were developed (Table 1). DNA was diluted to a concentration of 10 ng/μl. A total PCR volume of 15 μl, containing 1.5 μl 10× PCR Buffer, 0.75 μl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 μl 10 mM dNTP mix, 1 μM of each primer 5 mM (the forward primer with a fluorescent label, linked to the 5' end; Evrogen, Russia), 0.2 μl 5 u/μl HS *Taq* DNA Polymerase (Evrogen, Russia), 8.3 μl ddH<sub>2</sub>O, and 2 μl 10.0 ng DNA was used. The touchdown PCRs were run on DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) under the following conditions: 15 min of denaturation at 95 °C, 1 min at 94 °C, 1 min at 60–47 °C (temperature of primer annealing decreased in each cycle by 1 °C), 1 min at 72 °C (10 cycles); 1 min at 94 °C, 1 min at 47 °C and 1 min at 72 °C (25 cycles); terminal elongation at 72 °C for 20 min. The PCR products were diluted 1:10 or 1:50 times depending on the product concentration. For fragment analysis, 2 μl of diluted product was combined with 12 μl of total mixture of GeneScan 600 LIZ size standard (5 μl) and HiDi Formamide (190 μl) (Life Technologies). A fragment analysis was carried out on an ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). Genotyping was performed using GeneMapper 5 software (Life Technologies).

The obtained multi-locus genotypes of the samples were analyzed in the program GenAlEx V.6.5 (Peakall, Smouse, 2012) in order to identify the main parameters of intra-popu-

**Table 1.** Characteristics of the eight loci used in three multiplex assays

Locus	Dye	Set	Repeat motif	Annealing temperature, °C	Size range, bp	Number of alleles
VS2	HEX	I	(TC) <sub>14</sub>	53	86–90	3
VS6	FAM	I	(TG) <sub>8</sub>	47	154–168	3
SA2	ROX	I	(AG) <sub>17</sub>	51	134–168	4
VS11	FAM	II	(CAG) <sub>4</sub>	57	146–164	7
<i>Spth16</i>	HEX	II	(AC) <sub>6</sub> (TC) <sub>8</sub>	54	73–81	3
SA4	ROX	II	(AG) <sub>16</sub>	51	116–140	4
VS12	FAM	III	(TGG) <sub>4</sub>	50	166–178	5
<i>Spth20</i>	HEX	III	(AG) <sub>6</sub> (AC) <sub>7</sub>	60	85–121	12

lation variability (an average and effective number of alleles per locus, expected and observed heterozygosity, inbreeding coefficient, etc.). The genotypes were tested in the program Micro-Checker v.2.2 (Van Oosterhout et al., 2004) in order to identify “null-alleles”. The Ewens-Watterson tests for heterogeneity and for neutrality were made in the program PopGene32 (Yeh et al., 1999). Population genetic structure was inferred from multilocus microsatellite genotypes (K) using the Bayesian clustering algorithm in the program STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). For each number of inferred clusters (K) varied from 2 to 8. Five independent replicas of simulations with the number of iterations equal to 100000 with the previous heating period of 10.000 iterations were performed using the LOCPRIOR = 1 population data binding option. The most probable number of clusters was evaluated in the program Structure Harvester (Earl, von Holdt, 2012) using the method by G. Evanno et al. (2005) based on the selection of K with the highest likelihood ratio with the lowest standard deviation and the maximum increment (parameter DeltaK). Further processing of the results for the most probable K was performed in the program CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson, Rosenberg, 2007) and visualized in the program Distruct (Rosenberg, 2007).

## Results

For microsatellite analysis of *Spiraea* species, 37 heterologous microsatellite loci were tested, initially designed to study the genetic variability of the rare North American species *S. virginiana* (Brzyski, 2010), the Japanese species *S. thunbergii* (Ashizawa et al., 2012) and the Asian species *S. alpina* and *S. mongolica* (Khan et al., 2014).

According to the results of testing 37 microsatellite nuclear loci 12 did not show specific amplification, 9 were monomorphic, 8 contained “null-alleles”. Therefore, for further routine genotyping of *Spiraea* samples we selected eight pairs of primers demonstrating good reproducibility, stability and expressed polymorphism. Based on these loci, three multiplex panels (see Table 1) were designed in order to optimize routine by performing fragmented analysis on the capillary sequencer.

The selected loci were used to study the genetic polymorphism and population structure of closely related species *S. ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedryfolia* from seven Far Eastern and Siberian native populations. All the eight analyzed nuclear microsatellite loci in these *Spiraea* species were polymorphic. Most variable loci were *Spth20* and *VS11*,

12 and 7 alleles, respectively. The remaining loci (*VS2*, *VS6*, *SA2*, *Spth16*, *SA4*, and *VS12*) demonstrated lower allelic richness – from three to five alleles per locus. Among 105 individual specimens included in this study, homozygotes for “null-allele” were not found. A total of 41 allelic variants were identified, 7 alleles (17 %) of which were unique, occurring only in a single population. In the Shkotovsky population four unique alleles were detected. Based on the observed distributions of genotypes, the parameters of interpopulation variability were calculated (Table 2).

Analysis of genetic variability parameters in *Spiraea* spp. showed similar values of allele number per locus and observed heterozygosity among populations and slightly greater estimates of expected heterozygosity in the samples of *S. flexuosa* ( $N_A = 2.387$ ;  $H_O = 0.387 \pm 0.052$ ;  $H_E = 0.540 \pm 0.055$ ) as compared to *S. ussuriensis* ( $N_A = 2.781$ ;  $H_O = 0.385 \pm 0.079$ ;  $H_E = 0.453 \pm 0.072$ ) and *S. chamaedryfolia* ( $N_A = 2.875$ ;  $H_O = 0.331 \pm 0.071$ ;  $H_E = 0.505 \pm 0.069$ ).

The values of the main parameters of genetic polymorphism estimated by us indicated the average level of genetic diversity of the studied *Spiraea* species to be within the limits of the values earlier revealed for populations of *S. virginiana* (Brzyski, 2010), *S. thunbergii* (Ashizawa et al., 2012), *S. alpina* and *S. mongolica* (Khan et al., 2014) for the corresponding loci. The comparison of observed and expected heterozygosity showed that all the loci indicated a deficit of heterozygous genotypes within samples (positive values of  $F_{IS}$ ) for most of the studied microsatellite loci, except for the locus *Spth16*, which revealed a slight excess of heterozygotes (Table 3). Most genotype distributions within individual populations demonstrated also deficiency of heterozygotes (see Table 2). The Buryat population of *S. flexuosa* ( $F = 0.371$ ) and the Turochak population of *S. chamaedryfolia* ( $F = 0.340$ ) were distinguished by the increased values of Wright’s fixation index, which can be explained by the low population sizes of these species, as well as by the probable self-pollination and/or consanguineous matings leading to a high degree of inbreeding. These observations showed the species of the genus *Spiraea* to be often reproduced not only sexually, but also through the root offspring. Thus, the observed deficit of heterozygotes may be caused by closely related crosses and vegetative reproduction prevailing in the species of section *Chamaedryon*.

The study of the population structure of the selected species of *Spiraea* using Wright’s  $F$ -statistics (see Table 3) detected in

**Table 2.** Parameters of *Spiraea* genetic variability

Population code	$N_A$	$N_E$	$H_O$	$H_E$	$F$
uss	2.625	2.047	0.425 ± 0.079	0.466 ± 0.072	0.094
olg	2.000	1.679	0.297 ± 0.097	0.339 ± 0.083	0.156
gorn	3.000	2.005	0.396 ± 0.087	0.455 ± 0.072	0.144
zey	3.500	2.743	0.421 ± 0.054	0.561 ± 0.060	0.231
Average values for <i>S. ussuriensis</i>	2.781	2.119	0.385 ± 0.079	0.453 ± 0.072	0.156
shkt	3.750	2.488	0.424 ± 0.035	0.562 ± 0.050	0.231
ul	2.875	2.286	0.350 ± 0.069	0.518 ± 0.059	0.371
Average values for <i>S. flexuosa</i>	3.313	2.387	0.387 ± 0.052	0.540 ± 0.055	0.301
tur	2.875	2.265	0.331 ± 0.071	0.505 ± 0.069	0.390
Average values for all populations	2.946 ± 0.184	2.216 ± 0.112	0.378 ± 0.027	0.487 ± 0.026	0.239 ± 0.039

Note.  $N_A$  – average number of alleles per locus;  $N_E$  – effective number of alleles;  $H_O$  – observed heterozygosity;  $H_E$  – expected heterozygosity;  $F$  – fixation index.

individuals of *Spiraea* spp. populations a 24 % deficit of heterozygotes ( $F_{IS} = 0.242$ ) relative to the population and about 38 % being a deficit of heterozygous genotypes ( $F_{IT} = 0.383$ ) relative to the species *S. chamaedryfolia* s.l. About 19 % of the total observed variability resulted from interpopulation variation ( $F_{ST} = 0.191$ ). 81 % of all genetic polymorphism was concentrated within populations.

The loci with maximum differentiation of these populations were: *VS11*, *VS12*, *VS2*, and *VS6*. The test for heterogeneity of allele frequencies in geographically close samples from the Primorsky territory “olg” and “gorn” revealed significant differences between samples in allele frequencies in three loci: *VS11*, *VS2* and *SA4*, as well as in general (Table 4).

Based on the frequencies of alleles of the studied nuclear microsatellite loci the differentiation of the studied *Spiraea* spp. samples was analyzed. The standard genetic distances between populations range from 0.049 to 0.585. In general, genetic differentiation within the investigated populations corresponds to their geographical remoteness from each other.

**Table 3.** Values of Wright's  $F$ -statistics

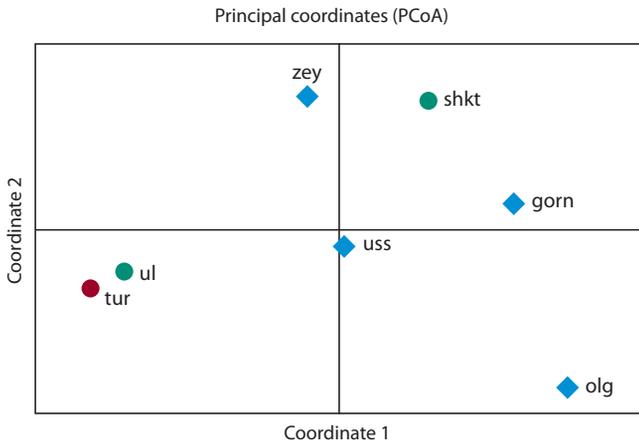
Locus	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
<i>VS11</i>	0.040	0.372	0.346
<i>VS12</i>	0.411	0.564	0.259
<i>VS2</i>	0.467	0.583	0.217
<i>VS6</i>	0.184	0.412	0.280
<i>Spth20</i>	0.323	0.454	0.194
<i>Spth16</i>	-0.051	-0.026	0.024
<i>SA2</i>	0.268	0.295	0.037
<i>SA4</i>	0.293	0.414	0.172
Average	0.242 ± 0.063	0.383 ± 0.067	0.191 ± 0.040

Note.  $F_{IS}$  – the inbreeding coefficient of an individual relative to the subpopulation to which it belongs;  $F_{IT}$  – the inbreeding coefficient of an individual relative to the whole population;  $F_{ST}$  – the coefficient of inbreeding of the subpopulation relative to the entire subdivided population.

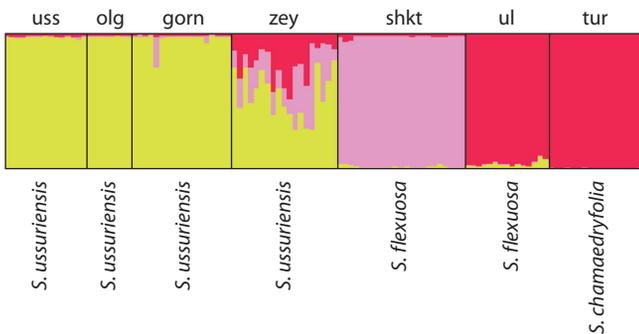
**Table 4.** The results of the test for heterogeneity of allele frequencies in the populations “olg” and “gorn” of *S. ussuriensis* on the studied SSR loci

Locus	Value of $\chi^2$	Number of degrees of freedom	Probability	Significance level
<i>VS11</i>	7.1633	1	0.0074	**
<i>VS12</i>	5.8196	3	0.1207	NS
<i>VS2</i>	11.2254	2	0.0037	**
<i>VS6</i>	0.8432	1	0.3585	NS
<i>Spth20</i>	10.2716	5	0.0679	NS
<i>Spth16</i>	0.9489	2	0.6222	NS
<i>SA2</i>	0.2941	2	0.8633	NS
<i>SA4</i>	28.5278	2	0.0000	***
In general	65.0938	18	0.0000	***

Note. The statistical significance of allele frequency shifts as determined by heterogeneity test is indicated by asterisks;  $p$  – the significance level; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS – not significant at the 5 % level.



**Fig. 1.** Projection of the studied *Spiraea* populations on the two-coordinate system according to the PCoA-analysis of the Nei genetic distances matrix.



**Fig. 2.** Analysis of the population structure of *S. chamaedryfolia* s.l. with the assumed number of genetic clusters  $K = 3$ .

The Turochak and Buryat populations (the genetic distance is 0.049) were characterized by the lowest genetic differences. Previously, we showed strong affinity of *S. flexuosa* and *S. chamaedryfolia* species by morphological features. Analysis of genetic distances using multidimensional scaling (PCoA) demonstrated genetic differentiation of populations under the study (Fig. 1). Corresponding to their mutual geographical location, a grouping of samples with each other was observed. Based on the results of the main coordinates analysis two groups can be distinguished; one – more Western – combining the samples “tur” and “ul” from Altai and Buryatia, which belong to different species *S. chamaedryfolia* and *S. flexuosa*, respectively; while the second Eastern one was differentiated not so clearly and included the Far Eastern samples of *S. flexuosa* and *S. ussuriensis*. The samples of “shkt” population of *S. flexuosa* were among the populations of *S. ussuriensis*.

The analysis of population structure was also conducted in the program STRUCTURE v. 2.3.4 on the basis of multilocus genotypes. The most probable number of initial genetic clusters  $K = 3$  was calculated corresponding to the provisional species – *S. chamaedryfolia*, *S. flexuosa*, *S. ussuriensis*. The identified clusters contribution to genotypes of populations and individuals as well as the distribution of individuals by population are visualized using different colors (Fig. 2). Taking into account the designation of clusters 1, 2 and 3 (K1, K2,

K3), colors are yellow, pink and red, respectively. It is possible to note a clear predominance in the studied samples of *S. ussuriensis* genetic cluster K1, and K1 represents the most of the gene pool of *S. ussuriensis* from Primorsky Krai. In the “zey” sample from the Amur region, along with the predominance of K1, K2 and K3 clusters make a significant contribution to all individuals in the population. Genetic cluster K2 dominates the sample “shkt” *S. flexuosa* from Primorsky Krai. Cluster K3 prevails in samples “tur” and “ul” from Altai and Buryatia belonging to different species – *S. chamaedryfolia* and *S. flexuosa*, respectively, and slightly represented in all the other samples. The content of the genetic cluster K1 in small quantities is shown in samples *S. flexuosa* – “shkt” and “ul”.

## Discussion

The values of the main parameters of genetic polymorphism established by us indicated the average level of genetic diversity of the studied populations of *Spiraea* in the investigated regions and were within the same range as of similar values estimated for populations *S. virginiana* (Brzyski, 2010), *S. thunbergii* (Ashizawa et al., 2012), *S. alpina* and *S. mongolica* (Khan et al., 2014). A higher level of interpopulation variability (37.3 %) was observed in *S. prunifolia* for *simpliciflora* from Korea on the basis of analysis of ISSR repeats (Huh, 2009), and the highest (73.7 %) of the studied one – in *S. alpina* from the Tibetan upland in Central Asia based on variability of *trnL-trnF* sequences of chloroplast DNA (Zhang et al., 2012).

A similar pattern of heterogeneous structure of populations of species close to *S. chamaedryfolia* s.l. was shown by us earlier on a combination of morphological characteristics (Polyakova, 2004). *S. chamaedryfolia*, *S. flexuosa* and *S. ussuriensis* were not significantly different in morphometric characteristics meanwhile weak ones being distinguishable qualitative (within such features as: degree of the pubescence of the abaxial part of the leaf, the shape of the axillary buds, color of shoots, the nature of “jagged” edges of the leaf blade). Almost all signs of intermediate forms between these species have been found. The clustering of populations of these species by morphological features showed a single, structurally heterogeneous group. Most likely, it is necessary to consider these samples as one species – *S. chamaedryfolia*. A small number of relatively reliable indicators-discriminators in *S. flexuosa* and *S. ussuriensis* indicate their intraspecific rank. Probably, a separate taxonomic status should be considered for coastal populations of *S. flexuosa* and *S. ussuriensis* (*S. flexuosa* from the samples of population “shkt” formed a separate genetic cluster K2). The hybrids of *S. ussuriensis* with another close species *S. elegans* were described by A.I. Pojarkova (1939). According to the morphological characteristics of the hybrids such specimens were found by us in various parts of the Amur region. Probably, individuals from the population “zey” of *S. ussuriensis* from the Amur region have a hybrid origin, as indicated by the combination of contributions of different genetic clusters to this population (see Fig. 2).

Thus, the developed multiplex panels of eight nuclear microsatellite loci made it possible to study the genetic variability and population structure of close relatives of *S. chamaedryfolia* s.l., suggest hybrid origin of some specimens and populations. For the most accurate decisions on subspecies structure

of the *S. chamaedryfolia* s.l. complex and about the distribution of certain taxonomic units and the composition of genetically heterogeneous populations analysis of ecological, morphological and genetic data is required as well as samples should be more representative.

### Acknowledgements

This study was conducted with financial support of Russian Fund of Basic Research (Project No. 15-04-03093, leader T.A. Poliakova), and also by the Program of Fundamental Researches of the Presidium of Russian Academy of Sciences No. 32 “Evolution of the organic world. The role and influence of planetary processes” (No. 0112-2018-0027 “The study of genetic mechanisms of evolution at the genomic and organismal level: the role of hybridization, the effects of global environmental change”); Program No. 41 “Biodiversity of natural systems and biological resources of Russia” (No. 0112-2018-0025), and Project No. 0112-2016-0002 “Research of gene pools and population-genetic structure of animals, plants and humans” from Russian State Budget (coordinator D.V. Politov).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Ashizawa K., Kimura M.K., Takahashi A., Lian Ch., Kuramoto N. Development of microsatellite markers in a riparian shrub, *Spiraea thunbergii* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* 2012;99(7):e283-e285. DOI 10.3732/ajb.1100587.
- Brzyski J.R. Isolation and characterization of microsatellite markers in the rare clonal plant, *Spiraea virginiana* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* 2010;97:e20-e22. DOI 10.3732/ajb.1000008.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12:12-15.
- Earl D.A., von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2012;4:359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7.

- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14:2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Huh M.K. Genetic diversity and population structure of *Spiraea prunifolia* for. *simpliciflora* by inter-simple sequence repeats. *J. Life Sci.* 2009;19,9:1183-1189.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 2007;23(14):1801-1806. DOI 10.1093/bioinformatics/btm233.
- Khan G., Zhang F., Gao Q., Jiao X., Fu P., Xing R., Zhang J., Chen S. Isolation of 16 microsatellite markers for *Spiraea alpina* and *S. mongolica* (Rosaceae) of the Qinghai-Tibet Plateau. *Appl. Plant Sci.* 2014;2(1):e1-e4. DOI 10.3732/apps.1300059.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>.
- Pojarkova A.I. *Spiraeoideae* Agardh. Flora of SSSR. Ed. V.L. Komarov. Moscow; Saint-Petersburg: Academy of Sciences of USSR Publ. 1939;9:279-318.
- Polyakova T.A. Vnutrividovaya izmenchivost' dal'nevostochnyh i sibirskih vidov roda *Spiraea* L. Novosibirsk, 2004. (in Russian)
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155:945-959.
- Rosenberg N.A. DISTRICT: a program for the graphical display of population structure. Publishers of Center for Computational Medicine and Biology. Department of Human Genetics. University of Michigan, 2007. <http://rosenberglab.bioinformatics.med.umich.edu/district.html>.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 2004;4:535-538. DOI 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. POPGENE Version 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. 1999; available at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- Zhang F.-Q., Gao Q.-B., Zhang D.-J., Duan Y.-Z., Li Y.-H., Fu P.-C., Xing R., Gulzar K., Chen S.-L. Phylogeography of *Spiraea alpina* in the Qinghai-Tibetan Plateau inferred from chloroplast DNA sequence variations. *J. Syst. Evol.* 2012;50(4):276-283. DOI 10.1111/j.1759-6831.2012.00194.x.

### ORCID ID

- T.A. Poliakova [orcid.org/0000-0002-8258-127X](http://orcid.org/0000-0002-8258-127X)  
A.V. Shatikhina [orcid.org/0000-0003-1573-478X](http://orcid.org/0000-0003-1573-478X)  
G.N. Bondarenko [orcid.org/0000-0002-2172-7634](http://orcid.org/0000-0002-2172-7634)

# Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources

I.N. Shamshin<sup>1</sup>✉, A.V. Shlyavas<sup>2</sup>, A.A. Trifonova<sup>3</sup>, K.V. Boris<sup>3</sup>, A.M. Kudryavtsev<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

At Pushkin and Pavlovsk Laboratories of the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) a diverse collection of local apple cultivars is maintained. Some of the cultivars are widely used in breeding programs for their ecological plasticity, increased adaptation to abiotic stress and disease resistance, still there have been no large-scale studies of these local cultivars for fruit storage ability. Fruit softening during storage is an important problem for apple production. Retention of desirable firmness after prolonged storage is one of the key requirements for new apple cultivars. Expansin and ethylene biosynthesis related genes are known to be involved in control of fruit softening in apple, and gene specific molecular markers have been reported. In this study the polymorphism and allelic configuration of ethylene and expansin biosynthesis related genes *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and *Md-Exp7* involved in control of fruit softening in 87 local apple cultivars from VIR Collection of Plant Genetic Resources were analyzed. PCR markers *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and SSR-marker *Md-Exp7* were used in the study. The allele frequencies in the collection generally coincided with the data from previous studies. *Md-ACS1* allele 2 associated with reduced ethylene production was found only in three local cultivars, while all the studied local cultivars were heterozygous for the *Md-ACO1* locus, as well as most modern Russian apple cultivars. Half of the studied local cultivars were heterozygous for *Md-Exp7* (198:202). Thirteen local cultivars with rare *Md-Exp7* alleles (206, 210 and 212) were detected. No association was found between the *Md-Exp7* genotype and the cultivars' maturation time. The obtained results can be used for additional evaluation of the cultivars' potential for breeding.

Key words: apple; local cultivars; ethylene production; expansin; fruit softening; marker assisted breeding.

## Полиморфизм генов биосинтеза этилена и экспансина у местных и стародавних сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) из коллекции генетических ресурсов растений ВИР

И.Н. Шамшин<sup>1</sup>✉, А.В. Шлявас<sup>2</sup>, А.А. Трифонова<sup>3</sup>, К.В. Борис<sup>3</sup>, А.М. Кудрявцев<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

В Пушкинских и Павловских лабораториях Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) представлена коллекция разнообразных местных и стародавних сортов яблони. Некоторые из них широко используются в селекционных программах благодаря экологической пластичности, повышенной устойчивости к абиотическому стрессу и болезням, однако масштабных исследований лежкости плодов у местных и стародавних сортов не проводилось. Лежкость плодов является важной проблемой для производителей. Сохранение твердости плодов во время длительного хранения – одно из ключевых требований, предъявляемых к новым сортам яблони. Показано, что гены биосинтеза этилена и экспансина вовлечены в контроль лежкости у яблони, разработаны специфичные молекулярные маркеры для этих генов. В настоящем исследовании проведен анализ аллельного разнообразия генов биосинтеза этилена и экспансина *Md-ACS1*, *Md-ACO1* и *Md-Exp7*, вовлеченных в контроль лежкости плодов у 87 местных и стародавних сортов яблони из коллекции генетических ресурсов растений ВИР. Были использованы ПЦР-маркеры *Md-ACS1*, *Md-ACO1* и SSR-маркер *Md-Exp7*. Частоты аллелей в изученной коллекции в целом совпадали с данными предыдущих исследований. Аллель 2 гена *Md-ACS1*, определяющий сниженный уровень синтеза этилена, был выявлен только у трех образцов, в то время как все изученные местные и стародавние сорта были гетерозиготны по локусу *Md-ACO1*, так же как и большинство изученных ранее современных отечественных сортов яблони. Половина проанализированных образцов были гетерозиготны по локусу *Md-Exp7* (198:202). Выявлено 13 местных и стародавних сортов, несущих редкие аллели гена *Md-Exp7* (206, 210 и 212). Не было обнаружено связи между сочетанием аллелей гена *Md-Exp7* и временем созревания изученных сортов. Полученные результаты могут быть использованы при дополнительной оценке потенциала изученных генотипов яблони для селекции.

Ключевые слова: яблоня; местные и стародавние сорта; синтез этилена; экспансин; лежкость плодов; маркер-ассоциированная селекция.

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shamshin I.N., Shlyavas A.V., Trifonova A.A., Boris K.V., Kudryavtsev A.M. Ethylene and expansin biosynthesis related genes polymorphism in local apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from VIR Collection of plant genetic resources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):660-666. DOI 10.18699/VJ18.408

УДК 575.111:634.11

Поступила в редакцию 28.04.2018

Принята к публикации 08.07.2018

© АВТОРЫ, 2018

Apple is a climacteric fruit that needs special postharvest handling to provide year-round high-quality apples to consumers. Shelf life – one of the key characteristics of apple cultivars – is limited by loss of firmness during storage and transportation, known as fruit softening. Shelf life depends not only on growing methods, harvesting time and successful application of postharvest technologies but also on the genetic basis of a cultivar. Firmness at harvest and after storage varies greatly among apple cultivars (Bratilova et al., 2015). Retention of desirable firmness after prolonged storage is one of the key requirements for new cultivars. Apple genotypes with prolonged storage time have always been of great interest to breeders, and DNA markers are widely used to study the genetic potential of *Malus* germplasm for breeding purposes. Today, in studies of fruit softening in Russian and international apple germplasm collections, ethylene and expansin biosynthesis related genes markers are widely used (Nybom et al., 2013; Suprun, Tokmakov, 2013; Savel'ev et al., 2014a, b; Shamshin, Savelieva, 2014).

Fruit ripening is controlled by internal ethylene concentration that plays an important role in apple softening and is associated with a rapid rise in ethylene production. Ethylene biosynthesis in plants is controlled by two enzymes: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACC synthase (ACS) (EC 4.4.1.14)) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO (EC 1.14.17.4)) that belong to large gene families. The two most well-studied genes encoding these enzymes in *M. domestica* are *Md-ACSI* (LG 15) and *Md-ACOI* (LG10) (Sunako et al., 1999; Harada et al., 2000; Oraguzie et al., 2004, 2007; Costa et al., 2005). Two alleles have been identified in the *Md-ACOI* locus: the cultivars homozygous for low ethylene allele 1 (525 bp) show better firmness retention than heterozygous cultivars and cultivars homozygous for allele 2 (587 bp) (Costa et al., 2005, 2010; Zhu, Barritt, 2008). Two alleles were also reported for the *Md-ACSI* locus (Harada et al., 2000; Oraguzie et al., 2004, 2007; Nybom et al., 2008; Zhu, Barritt, 2008). Allele 2 (655 bp) is associated with a reduced ethylene production while allele 1 (489 bp) results in normal ethylene production. Of these two loci, *Md-ACSI* appears to have the strongest effect on fruit storage (Nybom et al., 2013).

Expansins are the proteins involved in disruption of the non-covalent bonds between the hemicellulose matrix and the cellulose microfibril of a cell wall during fruit softening (Costa et al., 2008). A functional marker was developed based on the microsatellite motif within the untranslated region of expansin gene *Md-Exp7* (LG1) (Costa et al., 2008). The allelic composition of studied apple cultivars for the SSR marker was associated with differences in fruit softening: 198 bp (best firmness retention), 202 bp (intermediate) and 214 bp (worst) (Costa et al., 2008). Later screening of apple cultivars and species collections revealed some rare *Md-Exp7* alleles with unknown effect on fruit softening (Nybom et al., 2012, 2013; Savel'ev et al., 2014b).

These markers were used to study the allelic diversity of the *Md-ACSI*, *Md-ACOI* and *Md-Exp7* genes in different apple germplasm collections, including modern Russian apple cultivars and other species of genus *Malus* (Zhu, Barritt, 2008; Nybom et al., 2012, 2013; Suprun, Tokmakov, 2013; Savel'ev et al., 2014a, b; Shamshin, Savelieva, 2014). However, their

predictive power had turned out to be rather low (Nybom et al., 2013).

VIR collection of plant genetic resources is one of the most diverse and interesting in the Russian Federation and includes many varieties, forms and species of genus *Malus*. At Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR many local apple cultivars from Russia (distributed throughout the country and regional), Eastern and Western Europe, the Baltic countries and Scandinavia are present. This collection had never been previously involved in large-scale studies using DNA markers, although, some of the cultivars are widely used in breeding programs for their ecological plasticity, increased adaptation to abiotic stress and disease resistance, which makes a search for new donors of valuable traits among them a worthy affair.

The aim of this work was to study genetic diversity and allelic configuration of the ethylene and expansin biosynthesis genes (*Md-ACSI*, *Md-ACOI* and *Md-Exp7*) involved in control of fruit softening in local apple cultivars from the *ex situ* collection of Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR.

## Materials and methods

The plant material was obtained from Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR. The collection comprised 89 accessions, including 87 local apple cultivars and 2 reference cultivars. All the names of the accessions together with their catalogue numbers can be found in Table.

Total genomic DNA was extracted from the fresh leaves using the Qiagen DNeasy Plant Mini Kit following the manufacturers' protocols.

The sequences of the *Md-ACSI* and *Md-ACOI* primers and the relative PCR conditions were reported by T. Harada et al. (2000) and F. Costa et al. (2005) respectively, and the sequences of the *Md-Exp7* SSR primers and the relative PCR conditions were reported by F. Costa et al. (2008): *Md-ACOI*f 5'-TCCCCCAATGCACCACTCCA-3'; *Md-ACOI*r 5'-GATTCCTTGGCCTTCATAGCTTC-3'; *Md-ACSI*f 5'-AGAGAGATGCCATTTTTGTTCGTAC-3'; *Md-ACSI*r 5'-CCTACAAACTTGCCTGGGGATTATAAGTGT-3'; *Md-Exp7*f 5'-(Fam) CATAGAAGGTGGCATGAGCA-3'; *Md-Exp7*r 5'-TTTCTCCTCACACCCAAACC-3'.

PCR reactions were performed in T100 Thermal Cycler (BioRad) in a final mix of 15 µl containing 20 ng of genomic DNA, 0.25 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM of each primer, 1 U of Taq polymerase and 1.5 µl of 10x PCR-buffer (all components produced by Dialat (Russia)), using the allele specific primers manufactured by Evrogen (Russia).

The PCR products with *Md-ACSI* and *Md-ACOI* primers were separated on a 2 % agarose gel, stained with ethidium bromide and evaluated on a UV-light box, using GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

*Md-Exp7* SSR analysis of labeled amplification products was performed by capillary electrophoresis on ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer, (Thermo Fisher Scientific). The results were analyzed using GeneMapper v4.1 (Thermo Fisher Scientific).

## Results

For all the studied accessions, stable, clearly reproducible results were obtained from the three markers, and reference cultivars with known *Md-ACSI*, *Md-ACOI* and *Md-Exp7*

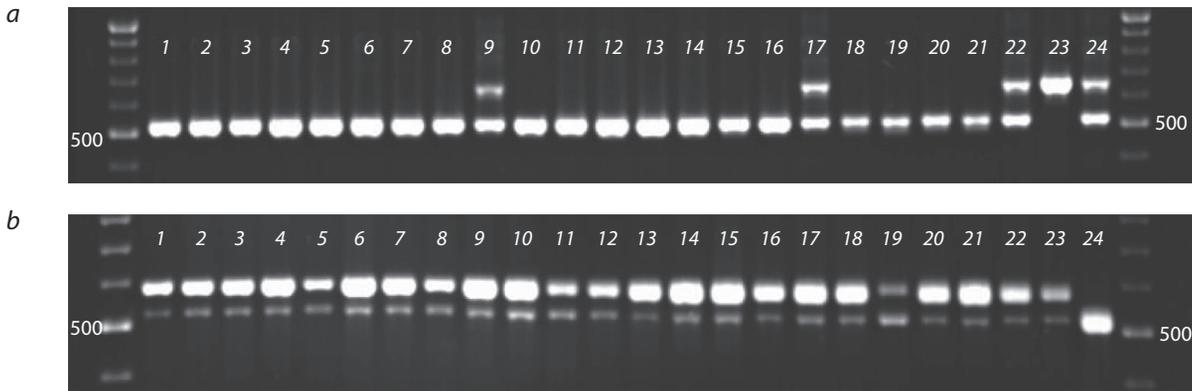
## Analyzed apple cultivars

Local cultivars	Catalogue number	Maturation time*	Allelic configuration		
			ACS1	ACO1	EXP7
Anis Seryj	43	A	1/1	1/2	198:202
Anis Shaczkiy	15358	A	1/1	1/2	202
Anisovka	47	A	1/2	1/2	198
Antonovka Monastyrskaya	68	A	1/1	1/2	198:202
Antonovka Obyknovennaya	74	W	1/1	1/2	198:202
Antonovka Obyknovennaya	21190	W	1/1	1/2	198:202
Antonovka Obyknovennaya	711	W	1/1	1/2	198:202
Antonovka Rzhavaya	31709	W	1/1	1/2	198:202
Arkad Krasnyj	31708	S	1/1	1/2	202
Arkad Letnij Zheltyj	140	S	1/1	1/2	198:202
Ahlebinskaya Pozdnee	25247	A	1/1	1/2	202
Bashkirskiy Krasavec	185	S	1/1	1/2	198:202
Beloe Osennee ot Ryzhego	23976	A	1/1	1/2	198
Naliv Belyj	1011	S	1/1	1/2	198:202
Bel' Chernyshevskaya	25211	A	1/1	1/2	198:202
Berezovka ot Isakova	24476	A	1/2	1/2	198:210
Borovinka	276	A	1/1	1/2	202:210
Borovinka Akulovskaya	38174	A	1/1	1/2	198:202
Borovinka Ivancovskaya	24781	A	1/1	1/2	198:202
Borovinka Moguchaya	25230	A	1/1	1/2	198:202
Buhovka	38211	A	1/1	1/2	198:202
Vargul'	350	A	1/1	1/2	202
Vinnoe	375	S	1/1	1/2	198:202
Voskovoe Prevoshodnoe	20343	W	1/1	1/2	198:202
Voskovoe Stepino	31711	A	1/1	1/2	198:202
Vydubeckaya Plakuchaya	31722	W	1/1	1/2	198
Golubok Kryugera	12247	A	1/1	1/2	198:202
Gravenshtejnskoe Russkoe	444	S	1/1	1/2	198:202
Grushovka Grebnickogo	20284	S	1/1	1/2	198:206
Grushovka Revel'skaya	10128	A	1/1	1/2	198:202
Grushovka Yudicheva	24484	A	1/1	1/2	202
Delyukinskoe	24470	A	1/1	1/2	198
Dynnoe	566	S	1/1	1/2	198:202
Zelenoe Knyazheskoe	25259	W	1/1	1/2	198:202
Zimnee ot Berdashkevicha	25234	W	1/1	1/2	202
Zimnee Uchkhozovskoe	23975	W	1/1	1/2	202:210
Kal'vil' Belyj Letnij	658	S	1/1	1/2	198
Kal'vil' Oranzhevyj	10134	A	1/1	1/2	198:202
Korichnoe Ananasnoe	29	A	1/1	1/2	198:202
Korichnoe Beloe	25257	A	1/1	1/2	198
Korichnoe Polosatoe	805	A	1/1	1/2	198:202
Korobovka	811	S	1/1	1/2	202
Korobovka Novaya	31726	A	1/1	1/2	202
Korolevskoe	21188	A	1/1	1/2	198:202
Lavia	21179	S	1/1	1/2	198

**End of Table**

Local cultivars	Catalogue number	Maturation time*	Allelic configuration		
			ACS1	ACO1	EXP7
Lajzanskoe Zimnee	20333	W	1/1	1/2	202
Letnee Rannee	25222	S	1/1	1/2	198:202
Limonovka	24782	A	1/1	1/2	198:202
Litovskoe Saharnoe	15391	S	1/1	1/2	198:202
Majskoe ot Ryzhego	23973	A	1/1	1/2	198:202
Mamutovskoe	15354	A	1/1	1/2	202:210
Medovoe ot Verevkina	20275	S	1/1	1/2	198
Mestnoe Lezhkoe	20281	W	1/2	1/2	202:210
Naliv Dymchatyj	24773	S	1/1	1/2	202
Nalivnoe Yantarnoe	1025	S	1/1	1/2	198:202
Novgorodchina	25217	S	1/1	1/2	202
Osennee Polosatoe	1083	A	1/1	1/2	198:202
Osennij Kvas	25255	A	1/1	1/2	198
Pajdeskoe Zimnee	1112	A	1/1	1/2	198
Papirovka	38223	S	1/1	1/2	202
Pestrushka	24774	S	1/1	1/2	202
Plodovitka Rannyaya	1216	S	1/1	1/2	198:202
Ponyavinskoe	1233	W	1/1	1/2	198:202
Putivka	25233	A	1/1	1/2	198:212
Pyl'tsamaaskoe Zimnee	20309	W	1/1	1/2	198:202
Rannyaya Pytalova	25254	S	1/1	1/2	198:202
Raspisnoe	10126	S	1/1	1/2	198:206
Rozovka	21194	S	1/1	1/2	198:202
Rozovka ot Ryzhego	23972	S	1/1	1/2	202
Severnyj Velikan	1503	W	1/1	1/2	206:210
Seyanec Trebu	433	A	1/1	1/2	198:202
Sladkoe Zimnee	21195	W	1/1	1/2	202
Slivochnoe	1573	A	1/1	1/2	198:202
Sujslepское	1626	S	1/1	1/2	202
Tellisaare	1654	W	1/1	1/2	202:210
Terent'evka	12309	A	1/1	1/2	202
Titovka	1667	A	1/1	1/2	202
Titovka klon	21196	A	1/1	1/2	198:202
Tyushkinskoe Krasnoe	10133	A	1/1	1/2	198:202
Fedorovskoe	24489	A	1/1	1/2	198:210
Chernoguz	14495	A	1/1	1/2	198
Chernoje Derevo	1766	W	1/1	1/2	198:202
Chulanovka	1774	S	1/1	1/2	198:202
Shelkovka	1809	S	1/1	1/2	202:206
Shtrejfling Krasnyj	25196	A	1/1	1/2	202
Yablonya Dobrynicheva	24487	A	1/1	1/2	198:202
Yalkarnan Kesa	20311	S	1/1	1/2	202:210
Reference cultivars					
Fuji			2/2	1/1	202
Granny Smith			1/2	1/2	198:202

\* S – summer; A – autumn; W – winter.



*Md-ACS1* (a) and *Md-ACO1* (b) polymorphisms detected in the studied local apple cultivars.

a: 1 – Anis Seryi; 2 – Anis Ahaczki; 3 – Vargul'; 4 – Vinnoe; 5 – Voskovoe Prevoshodnoe; 6 – Voskovoe Stepino; 7 – Vydubeckaya Plakuchaya; 8 – Gravenshtejnskoe Russkoe; 9 – Anisovka; 10 – Grushovka Grebnickogo; 11 – Grushovka Revel'skaya; 12 – Grushovka Yudicheva; 13 – Delyukinskoe; 14 – Dynnoe; 15 – Zelenoe Knyazheskoe; 16 – Zimnee Uchkhozovskoe; 17 – Berezovka ot Isakova; 18 – Kal'vil' Belyj Letnij; 19 – Kal'vil' Oranzhevyj; 20 – Korichnoe Ananasnoe; 21 – Korichnoe Beloe; 22 – Mestnoe Lezkoe; 23 – Fuji; 24 – Granny Smith.

b: 1 – Borovinka Moguchaya; 2 – Buhovka; 3 – Vargul'; 4 – Vinnoe; 5 – Voskovoe Prevoshodnoe; 6 – Voskovoe Stepino; 7 – Vydubeckaya Plakuchaya; 8 – Golubok Kryugera; 9 – Gravenshtejnskoe Russkoe; 10 – Grushovka Grebnickogo; 11 – Grushovka Revel'skaya; 12 – Grushovka Yudicheva; 13 – Delyukinskoe; 14 – Dynnoe; 15 – Zelenoe Knyazheskoe; 16 – Zimnee ot Bardashkevicha; 17 – Zimnee Uchkhozovskoe; 18 – Kal'vil' Belyj Letnij; 19 – Kal'vil' Oranzhevyj; 20 – Korichnoe Ananasnoe; 21 – Korichnoe Beloe; 22 – Korichnoe Polosatoe; 23 – Granny Smith; 24 – Fuji.

genotypes were used to confirm the results (see Table, Figure, a and b).

***Md-ACS1* and *Md-ACO1* loci.** Analysis of the *Md-ACS1* locus polymorphism of 87 local apple cultivars from the collection allowed to identify two known alleles: *Md-ACS1*-1 (489 bp) and *Md-ACS1*-2 (655 bp). Eighty four samples were homozygous for the *Md-ACS1*-1 allele, while only three samples – Anisovka (47), Berezovka ot Isakova (24476) and Mestnoe Lezhkoe (20281) – were heterozygous for this locus (see Figure, a). Among the samples studied, no homozygotes for the *Md-ACS1*-2 allele were found.

All the studied local cultivars were heterozygous for the *Md-ACO1* locus and carried alleles *Md-ACO1*-1 (525 bp) and *Md-ACO1*-2 (587 bp) (see Figure, b). No homozygous samples were identified from these alleles.

***Md-Exp7* locus.** Microsatellite marker *Md-Exp7* allowed to identify five alleles in the studied samples (198, 202, 206, 210, 212). Alleles 198 and 202 bp were the most common in the studied cultivars. In 44 local cultivars a combination of 198:202 alleles was detected, 19 local cultivars were homozygous for allele 202, 11 local cultivars – for allele 198 provided that the studied samples do not have any undetected allele. The presence of three rare alleles (206, 210, 212 bp) was detected in 13 local cultivars studied. So, allele 210 was identified in nine local cultivars, allele 206 – in four, and allele 212 – in one cultivar (see Table).

## Discussion

***Md-ACS1* and *Md-ACO1* loci.** In our study of 87 local apple cultivars from the collection of Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR the *Md-ACS1* allele 2, associated with low ethylene production, was very rare. We identified only three heterozygous genotypes *Md-ACS1*-1/2 (Anisovka, Berezovka ot Isakova and Mestnoe Lezkoe), while the remaining 84 local cultivars were homozygous for allele 1 (see Table).

In the previous screening of old and modern apple cultivars collection, out of 127 studied cultivars only eight were homo-

zygous for *Md-ACS1* allele 2, while 46 cultivars were heterozygous and 73 – homozygous for allele 1 (Nybom et al., 2013). In contrast, of 60 cultivars/selections from Washington State University apple breeding program, 28 were homozygous for allele 2, 27 were heterozygous, and 5 – homozygous for allele 1 (Zhu, Barritt, 2008).

The results reported for 48 modern Russian apple cultivars showed that 19 cultivars were heterozygous for the *Md-ACS1* locus, and 17 and 8 cultivars were homozygous for alleles 1 and 2 respectively (Suprun, Tokmakov, 2013). Among 72 apple cultivars from the collection of Michurin All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Crops only nine Russian cultivars had the *Md-ACS1*-1/2 genotype and no homozygotes for allele 2 were detected (Savel'ev et al., 2014a).

It was reported that relative frequencies of the two *Md-ACS1* alleles varied depending on time of introduction of apple cultivars and the frequency of desirable allele 2 had increased in modern apple cultivars, indicating that this allele has been favored by selection for improved fruit quality in modern apple breeding programs (Nybom et al., 2008, 2012). At the same time, later statistical evaluation did not reveal any effect of cultivar age on fruit softening (Nybom et al., 2013).

Our data have confirmed that *Md-ACS1*-2 allele frequency is low in old local apple cultivars and is increasing not only in foreign apple cultivars, but also in modern Russian apple cultivars, which may be due to a wider involvement of foreign material in the breeding process.

All the studied 87 local apple cultivars were heterozygous for *Md-ACO1* locus (see Figure, b). Similar results were reported for 48 modern Russian apple cultivars (Suprun, Tokmakov, 2013) and 72 apple cultivars from the collection of Michurin All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Fruit Crops (Savel'ev et al., 2014a). As well as among the 95 studied cultivars and selections used as parents in Washington State University apple breeding program 76 were also heterozygous for *Md-ACO1* (Zhu, Barritt, 2008).

It was suggested that selection for fruit firmness has had little impact on increasing the frequency of low ethylene producing *ACO1-1* homozygotes in apple breeding programs (Zhu, Barritt, 2008). At the same time in the study of 127 old and modern apple cultivars, the majority was homozygous for undesirable allele *Md-ACO1-2*, and the study showed no significant variation in softening rate during storage among the cultivars with different allele configurations (Nybom et al., 2013).

*Md-ACSI* and *Md-ACO1* allelic diversity was also studied in 35 samples of genus *Malus* representing sections *Docyniopsis*, *Chloromeles*, *Gymnomeles* and *Malus* (Shamshin, Savelieva, 2014). Allele 2 of the *Md-ACSI* gene, associated with reduced level of ethylene synthesis, was identified only in two species: *M. prunifolia* (K2454) and *M. silvestris* (K41639), the latter was homozygous for allele 2. Of the 35 studied genotypes, 22 were heterozygous and 12 were homozygous for the *Md-ACO1-1* allele (Shamshin, Savelieva, 2014).

***Md-Exp7* locus.** Among the three common *Md-Exp7* alleles (198, 202 and 214 bp) described by F. Costa et al. (2008), in our study we did not find allele 214 bp, but identified three additional alleles – 206, 210 and 212 bp. The most common genotype was 198:202 found in 44 local cultivars, while 19 were homozygous for allele 202 and 11 – for allele 198 provided that they really were homozygous and did not carry an undetected allele (see Table). Moreover, 13 local cultivars had three rare alleles. Allele 210 was found in nine genotypes, allele 206 – in four and allele 212 – in one genotype, while cultivar Severnyj Velikan was heterozygous for rare alleles 206:210 (see Table).

The uncommon alleles were previously described in several studies. H. Nybom et al. (2012, 2013) found the same common alleles, and additional alleles at lower frequencies: 196, 200, 206, 208, 210, 212, 216 and 220 bp. It should be noted that alleles 204, 210, 220, 226 and 230 bp were also detected in wild species of genus *Malus* (Savel'ev et al., 2014b). Since there have been no data on the effect of these alleles on fruit softening, their role remains uncertain and requires further study.

In the study by H. Nybom et al. (2012, 2013) of *Md-Exp7* locus polymorphism in a large apple collection the most common genotype was 202:202 and genotype 198:202 was also quite common. It was shown that allele 202 frequency is increasing in modern apple cultivars, suggesting that this marker has been favored by selection in modern apple breeding programs and therefore is more likely to be associated with low softening (Nybom et al., 2012). It was also reported that the cultivars homozygous for marker 202 showed a significantly lower softening compared to heterozygous cultivars (198:202) (Nybom et al., 2013).

In our study among 87 local cultivars the 198:202 genotype was the most common. We did not find association between early-maturing and late-maturing cultivars and the *Md-Exp7* genotype (see Table). In previously studied Russian apple cultivars collection the most common were genotypes homozygous for allele 202 and 198:202 genotypes (Savel'ev et al., 2014a). At the same time, analysis of *Md-Exp7* locus polymorphism in the *Malus* species representing four sections of the genus, showed that allele 202 was the most common and the authors suggested that this allele was the oldest one, while in species of section *Malus* that includes *M. domestica*,

the most common were alleles 198, 202 and 204 bp (Savel'ev et al., 2014b).

Thus, the allelic diversity of the ethylene (*Md-ACSI*, *Md-ACO1*) and expansin (*Md-Exp7*) biosynthesis genes has been evaluated for the first time in the collection of local apple cultivars from Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR. The allele frequencies in the collection generally coincide with the data of previous studies. The *Md-ACSI* allele 2 frequency is low in old local apple cultivars and is increasing in modern apple cultivars, while all the studied local cultivars are heterozygous for *Md-ACO1* locus, as well as most modern Russian apple cultivars. Half of the studied local cultivars are heterozygous for *Md-Exp7* (198:202). No association has been found between the *Md-Exp7* genotype and the maturation time of the cultivars. The obtained results can be used for additional evaluation of the local apple cultivars potential for breeding.

### Acknowledgements

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 17-29-08020, the plant material for this study was provided by Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR under State contract No. AAAA-A17-117030910078-3.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Bratilova N.P., Moksina N.V., Gerasimova O.A., Chepelev N.L. Stages of picking and storage for different cultivars of apple fruit in the Botanical garden named after V.M. Krutovskiy. The Bulletin of Kras-GAU. 2015;11:146-150.
- Costa F., Peace C.P., Stella S., Serra S., Musacchi S., Bazzani M., Sansavini S., Van de Weg W.E. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.). J. Expt. Bot. 2010;61(11):3029-3039. DOI 10.1093/jxb/erq130.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchin 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. DOI 10.1007/s10681-005-6805-4.
- Costa F., Van de Weg W.E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S., Sansavini 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. DOI 10.1007/s11295-008-0133-5.
- Harada T., Sunako T., Wakasa Y., Soejima J., Satoh T., Niizeki M. An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACSI*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. Theor. Appl. Genet. 2000;101:742-746. DOI 10.1007/s001220051539.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Garkava-Gustavsson L., Sehic J., Tahir I. Selection for improved fruit texture and storability in apple. Acta Hort. 2012;934(2):849-854. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.934.112.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J., Hertog M. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm. Tree Genet. Genomes. 2013;9:279-290. DOI 10.1007/s11295-012-0554-z.
- Nybom H., Sehic J., Garkava-Gustavsson L. Modern apple breeding is associated with a significant change in allelic ratio of the ethylene production gene *Md-ACSI*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 2008;83:673-677. DOI 10.1080/14620316.2008.11512442.

- Oraguzie N.C., Iwanami H., Soejima J., Harada T., Hall A. Inheritance of *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Theor. Appl. Genet.* 2004;108:1526-1533. DOI 10.1007/s00122-003-1574-8.
- Oraguzie N.C., Volz R.K., Whitworth C.J., Bassett H.C.M., Hall A.J., Gardiner S. Influence of *Md-ACS1* allelotype and harvest season within an apple germplasm collection on fruit softening during cold air storage. *Postharvest Biol. Technol.* 2007;44:212-219. DOI 10.1016/j.postharvbio.2006.12.013.
- Savel'ev N.I., Shamshin I.N., Kudryavtsev A.M. Apples for the alleles of genes of shelf life and quality of fruits. *Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* 2014a;3:17-20.
- Savel'ev N.I., Shamshin I.N., Savel'eva N.N., Lyzhin A.S. Polymorphism for the *Md-EXP-7* gene for expansin biosynthesis in wild species of the genus *Malus* Mill. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2014b;18(4/1): 713-717.
- Shamshin I.N., Savelieva N.N. Identifying the gene sources for ethylene biosynthesis (*Md-ACS1* and *Md-ACO1*) in genoplasm of wild apple tree species of the genus *Malus* (L.) Mill. *Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* 2014;4:35-37.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. An allele of the ripening-specific 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 1999;119(4):1297-1304. DOI 10.1104/pp.119.4.1297.
- Suprun I.I., Tokmakov S.V. Allelic diversity of ethylene biosynthesis related *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genes in Russian apple germplasm. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013;17(23):298-302.
- Zhu Y., Barritt B.H. *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genet. Genomes.* 2008;4:555-562. DOI 10.1007/s11295-007-0131-z.

---

#### ORCID ID

I.N. Shamshin [orcid.org/0000-0002-4464-1876](https://orcid.org/0000-0002-4464-1876)  
A.V. Shlyavas [orcid.org/0000-0002-8009-6780](https://orcid.org/0000-0002-8009-6780)  
A.A. Trifonova [orcid.org/0000-0001-9618-5932](https://orcid.org/0000-0001-9618-5932)  
K.V. Boris [orcid.org/0000-0002-8479-4949](https://orcid.org/0000-0002-8479-4949)  
A.M. Kudryavtsev [orcid.org/0000-0001-6029-0730](https://orcid.org/0000-0001-6029-0730)

# Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии

Т.И. Одинцова , М.П. Слезина, Е.А. Истомина

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

Антимикробные пептиды (АМП) – важнейшие компоненты защитной системы растений и животных, они представляют собой древний механизм врожденной устойчивости, обеспечивающий «первую линию обороны» против патогенов. Выделяют несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки (ЛПБ), геверино- и ноттиноподобные пептиды, гарпинины, а также макроциклические пептиды (циклотиды). Обзор посвящен характеристике семейства тионинов. Тионины – характерное только для растений семейство АМП, состоящее из коротких (~5 кДа) цистеин-богатых пептидов (с 6 или 8 остатками цистеина в молекуле), которые обладают антимикробными и токсическими свойствами. На основании сходства аминокислотных последовательностей и расположения дисульфидных связей выделяют пять структурных классов тионинов. Установлена пространственная структура ряда тионинов. Показано, что амфипатическая молекула тионина имеет форму греческой буквы Г, у которой длинное плечо образовано двумя антипараллельными α-спиралями, а короткое – двумя параллельными β-тяжами. Выявлены аминокислотные остатки, ответственные за антимикробную активность тионинов. Тионины синтезируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Тионины являются защитными пептидами растений против патогенных бактерий и грибов, которые действуют в микромолярных концентрациях непосредственно на мембраны микроорганизмов, хотя детальный механизм действия этих АМП до конца не выяснен. Помимо патогенов растений, тионины подавляют рост ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов человека, таких как *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Тионины токсичны для различного типа клеток, включая линии раковых клеток млекопитающих. Трансгенные растения, в которых экспрессируются гены тионинов, обладают повышенной устойчивостью к патогенам. Широкий спектр антимикробной и токсической активности тионинов открывает возможности их практического использования в сельском хозяйстве и медицине.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; тионины; иммунитет растений.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Одинцова Т.И., Слезина М.П., Истомина Е.А. Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):667-675. DOI 10.18699/VJ18.409

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):667-675. DOI 10.18699/VJ18.409

УДК 615.331:632.9

Поступила в редакцию 21.03.2018

Принята к публикации 18.06.2018

© АВТОРЫ, 2018

 e-mail: odintsova2005@rambler.ru

## Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology

T.I. Odintsova , M.P. Slezina, E.A. Istomina

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of defense system in both plants and animals. They represent an ancient mechanism of innate immunity providing rapid first line of defense against pathogens. Plant AMPs are classified into several families: thionins, defensins, non-specific lipid-transfer proteins, hevein- and knottin-type peptides, hairpinins and macrocyclic peptides (cyclotides). The review focuses on the thionin family. Thionins comprise a plant-specific AMP family that consists of short (~5 kDa) cysteine-rich peptides containing 6 or 8 cysteine residues with antimicrobial and toxic properties. Based on similarity in amino acid sequences and the arrangement of disulfide bonds, five structural classes of thionins are discriminated. The three-dimensional structures of a number of thionins have been determined. The amphipathic thionin molecule resembles the Greek letter Г, in which the long arm is formed by two anti-parallel α-helices, and the short one – by two parallel β-strands. The residues responsible for the antimicrobial activity of thionins have been identified. Thionins are synthesized as precursor proteins consisting of a signal peptide, the mature peptide region and the C-terminal prodomain. Thionins protect plants from pathogenic bacteria and fungi acting directly on the membranes of microorganisms at micromolar concentrations, although their precise mode of action remains unclear. In addition to plant pathogens, thionins inhibit growth of a number of human pathogens and opportunistic microorganisms, such as *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Thionins are toxic to different types of cells including mammalian cancer cell lines. Transgenic plants expressing thionin genes display enhanced resistance to pathogens. A wide range of biological activities makes thionins promising candidates for practical application in agriculture and medicine.

Key words: antimicrobial peptides; thionins; plant immunity.

В течение жизни растения постоянно сталкиваются с патогенами, для борьбы с которыми они используют различные защитные механизмы. Среди них – синтез антимикробных соединений белковой и небелковой природы. Важнейшими белковыми компонентами защитной системы растений являются антимикробные пептиды (АМП), которые представляют собой древний механизм врожденной устойчивости, обеспечивающий не требующую больших затрат энергии «первую линию обороны» против патогенов. Антимикробные пептиды растений обладают рядом общих свойств: небольшой размер молекул (молекулярная масса менее 10 кДа), положительный заряд и амфифильность структуры (Egorov, Odintsova, 2012; Tam et al., 2015; Sarethy, 2017). Эти структурные особенности позволяют АМП непосредственно или с участием рецепторов взаимодействовать с мембранами микроорганизмов, нарушая их проницаемость, и таким образом ингибировать рост и развитие патогенов. Подавляющее большинство АМП растений относится к цистеин-богатым пептидам, в молекулах которых четное число остатков цистеина (2, 4, 6, 8 и 10), образующих дисульфидные связи, что придает молекулам АМП высокую структурную стабильность. По гомологии аминокислотных последовательностей, цистеинового мотива и пространственной структуры выделяют несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки, гевеино- и ноттиноподобные пептиды, гарпинины, а также макроциклические пептиды (циклотиды).

Интерес, проявляемый к АМП в последние годы, связан с возможностью использования их в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями культурных растений, а также в медицине для разработки лекарственных препаратов нового поколения (de Souza Cândido et al., 2014; Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

## Тионины

### Структурные особенности

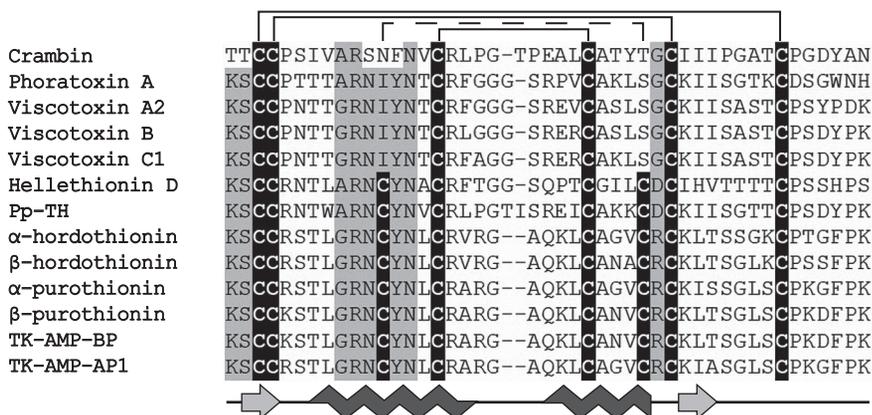
Тионины представляют собой короткие (~5 кДа) цистеин-богатые пептиды, которые были впервые обнаружены в эндосперме зерновок пшеницы (Balls et al., 1942). В дальнейшем они были найдены у многих одно- и двудольных растений. Описано около 100 последовательностей тионинов из 15 видов растений (Stec, 2006). В отличие от семейства дефензинов, представители которого обнаружены не только у растений, но и у животных, тионины встречаются только у растений. По числу остатков цистеина тионины разделяют на две основные группы: пептиды, содержащие шесть и восемь остатков цистеина соответственно. На основании сходства аминокислотных последовательностей и расположения дисульфидных связей выделяют пять структурных классов тионинов (I–V). Тионины класса I содержатся в эндосперме семян злаковых. Они состоят из 45 аминокислот, из которых 8 приходится на цистеин, и у них высокий положительный заряд молекул. Тионины класса II присутствуют в листьях и орехах паразитического растения *Pyricularia pubera*, а также в листьях ячменя *Hordeum vulgare*. Они менее основны, чем тионины класса I, и состоят из 46–47 аминокислотных остатков. У них также восемь остатков цистеина в молекуле. Тионины

класса III выделены из различных видов омелы, таких как *Viscum album*, *Phoradendron tomentosum*, *Phoradendron liga* и *Dendrophthora clavata*. Они содержат 45–46 аминокислот, имеют три дисульфидные связи и их заряд такой же, как у тионинов класса II. Тионины класса IV состоят из 46 аминокислот, имеют три дисульфидные связи и нейтральны. Они выделены из семян *Crambe abyssinica*. К тионинам класса V относится тионин пшеницы, который является укороченным вариантом тионинов класса I. Аминокислотные последовательности тионинов различных классов обладают высоким сходством. На рис. 1 представлены аминокислотные последовательности тионинов некоторых видов растений.

Все тионины синтезируются в виде препробелков с молекулярной массой ~18 кД, которые состоят из сигнального пептида, основного тионинового домена и кислого С-концевого пропептида. В пределах вида С-концевые пропептиды высоко консервативны, особенно это касается положения в полипептидной цепи шести остатков цистеина (Schradler-Fischer, Apel, 1993). Существует также гомология, хотя и менее выраженная, между кислыми пропептидами тионинов разных видов растений. Консерватизм последовательности С-концевого продомена свидетельствует о большой функциональной значимости этой области предшественника. Удаление сигнального пептида и С-концевого пропептида происходит в ходе посттрансляционного процессинга предшественника. Из листьев табака выделена вакуолярная протеиназа, которая отщепляет сигнальный пептид от предшественника, что необходимо для активации токсичных свойств тионина (Romero et al., 1997). Из этиолированных проростков ячменя получена сериновая протеиназа – субтилаза, относящаяся к семейству пирролизиннов, которая осуществляет процессинг предшественника тионина, отщепляя С-концевой продомен (Plattner et al., 2015). Роль кислого С-концевого продомена до конца не изучена. Предполагают, что он необходим для направленного транспорта зрелого тионина к месту назначения – в вакуоли, клеточные стенки или белковые тела. Кроме того, этот продомен служит для нейтрализации токсических свойств зрелого тионина до поступления в межклеточное пространство или в вакуоли, т.е. для защиты клеток растения от собственного токсина (Bohlmann, 1994). Возможно также, что он является внутримолекулярным шапероном, обеспечивающим фолдинг тионина.

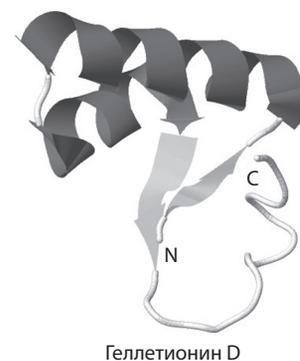
При атаке патогена экспрессия генов тионинов регулируется метилжасмонатом – растительным гормоном, который играет ключевую роль в защитных реакциях растений. Показано, что у *Arabidopsis thaliana* регуляция экспрессии генов тионинов *Thi2.1* и *Thi2.2* осуществляется по-разному. Экспрессия *Thi2.1* в цветках индуцируется заражением *Fusarium oxysporum* и регулируется метилжасмонатом, в то время как экспрессия *Thi2.2* наблюдается в проростках и не индуцируется жасмонатом (Stotz et al., 2013).

Методом рентгеноструктурного анализа определена трехмерная структура 6-Сус крамбина семян *C. abyssinica*, 8-Сус тионинов пшеницы и ячменя, а также вискотоксина АЗ листьев омелы. Структура некоторых тионинов была определена методами спектроскопии ядерного магнит-

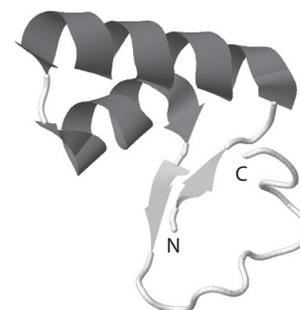


**Рис. 1.** Аминокислотные последовательности тионинов: крамбин *C. abyssinica* (GenBank P01542.2); форатоксин А *P. tomentosum* (GenBank P01539.1); вискотоксин А2 (GenBank P32880.1); вискотоксин В (GenBank P08943.2); вискотоксин С1 (GenBank P83554.1) из *V. album*; геллеттионин D *Helleborus purpurascens* (GenBank P60057.1); Pp-TH *P. pubera* (GenBank P07504.1);  $\alpha$ -гордотионин (GenBank AAA32966.1) и  $\beta$ -гордотионин (GenBank 1206255A) *H. vulgare*;  $\alpha$ -пуротионин (GenBank CAA65313.1) и  $\beta$ -пуротионин (GenBank CAA65312.1) из *Triticum aestivum*; TK-AMP-BP и TK-AMP-AP1 *Triticum kiharae* (наши неопубликованные данные).

Остатки цистеина выделены белым шрифтом на черном фоне, функционально значимые аминокислотные остатки – черным шрифтом на сером фоне. Линиями сверху обозначены дисульфидные связи. Внизу представлена вторичная структура тионинов:  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структурные элементы изображены серым и светло-серым цветом соответственно.



Геллеттионин D



Вискотоксин C1

ного резонанса: форатоксина А, крамбина, вискотоксина А3 и С1,  $\alpha$ -гордотионина, пуротионина и геллеттионина. Во всех случаях показано, что амфипатическая молекула тионина имеет форму греческой буквы Г, у которой длинное плечо образовано двумя антипараллельными  $\alpha$ -спиралями, а короткое – двумя параллельными  $\beta$ -тяжами. С-концевой участок тионинов образует петлю (рис. 2). Показано, что желобок между двумя структурными доменами играет важную роль в функционировании тионинов (Stec et al., 2004; Oard et al., 2007).

### Пуротионины пшеницы

У гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (AABBDD) описано три тионина класса I, называемых пуротионинами. Это пуротионины  $\beta$ ,  $\alpha_B$  и  $\alpha_D$ , которые кодируются генами *pur A1*, *pur B1* и *pur D1*, расположенными на длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D соответственно (Sánchez-Monge et al., 1979). Два  $\beta$ -пуротионина описано у доноров генома А полиплоидных пшениц – *T. monococcum* и *T. urartu*. Кроме того, у гексаплоидной пшеницы есть тионины класса V, гены которых располагаются на расстоянии нескольких килобаз от генов тионинов класса I на длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D (Castagnaro et al., 1992). Нами в гексаплоидной пшенице *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch., которая представляет собой синтетический аллополиплоид, полученный при скрещивании *Triticum timopheevii* с *Aegilops tauschii* и обладающий повышенной устойчивостью к патогенам, обнаружено также три тионина, два из которых – Tk-AMP-AP1 и Tk-AMP-BP – были выделены из семян и просеквенированы (наши неопубликованные данные). Структура Tk-AMP-BP оказалась идентичной  $\beta$ -пуротионину *T. aestivum*. Значительно большее разнообразие пуротионинов было выявлено при анализе транскриптомов *T. kiharae* методом высокоэффективного параллельного секвенирования (NGS) (наши неопубликованные данные). Для поиска транскриптов предшественников тионинов был использован алгоритм, основанный на консервативных цистеиновых мотивах, характерных для С-концевого продомена и зрелого пептида предшественников тионинов (Silverstein et al., 2007). В результате в транскриптомах проростков пшеницы было обнаружено 15 транскриптов, кодирующих предшественники с характерными для тионинов цистеиновыми мотивами (рис. 3). Все они содержат специфичный для тионинов консервативный 6-цистеиновый С-концевой продомен. У транскрипта c32154\_g11 делегирована область цистеин-богатого зрелого тионина. Этот белок имеет 100 % сходство с uncharacterized protein

**Рис. 2.** Пространственная структура тионинов: геллеттионин D (PDB: 1NBL) *H. purpurascens* и вискотоксин C1 (PDB: 1ORL) *V. album*.

$\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структурные элементы выделены серым и светло-серым цветом соответственно. N – N-конец молекулы; C – C-конец молекулы.

LOC109759362 из *A. tauschii* subsp. *tauschii* в базе данных NCBI. Еще у двух высоко гомологичных предшественников область зрелого пептида имеет всего четыре остатка цистеина, что не характерно для тионинов. Эти белки также аннотируются как uncharacterized proteins *A. tauschii* subsp. *tauschii* (99 и 100 % сходство для c41117\_g1 и c45947 соответственно). Все остальные предшественники имеют высокое сходство (64–100 %) с тионинами или тиониноподобными белками. У четырех предшественников – типичный для тионинов 8-цистеиновый домен с расположенными подряд двумя остатками цистеина в N-концевой области молекулы. У других предшественников в тиониновом домене расположены подряд три остатка цистеина, а число остатков цистеина варьирует от семи до десяти.

Интересно, что у другого представителя злаковых – колосняка песчаного (*Leymus arenarius* L.) – транскриптомным анализом нами было также выявлено 15 транскриптов, кодирую-

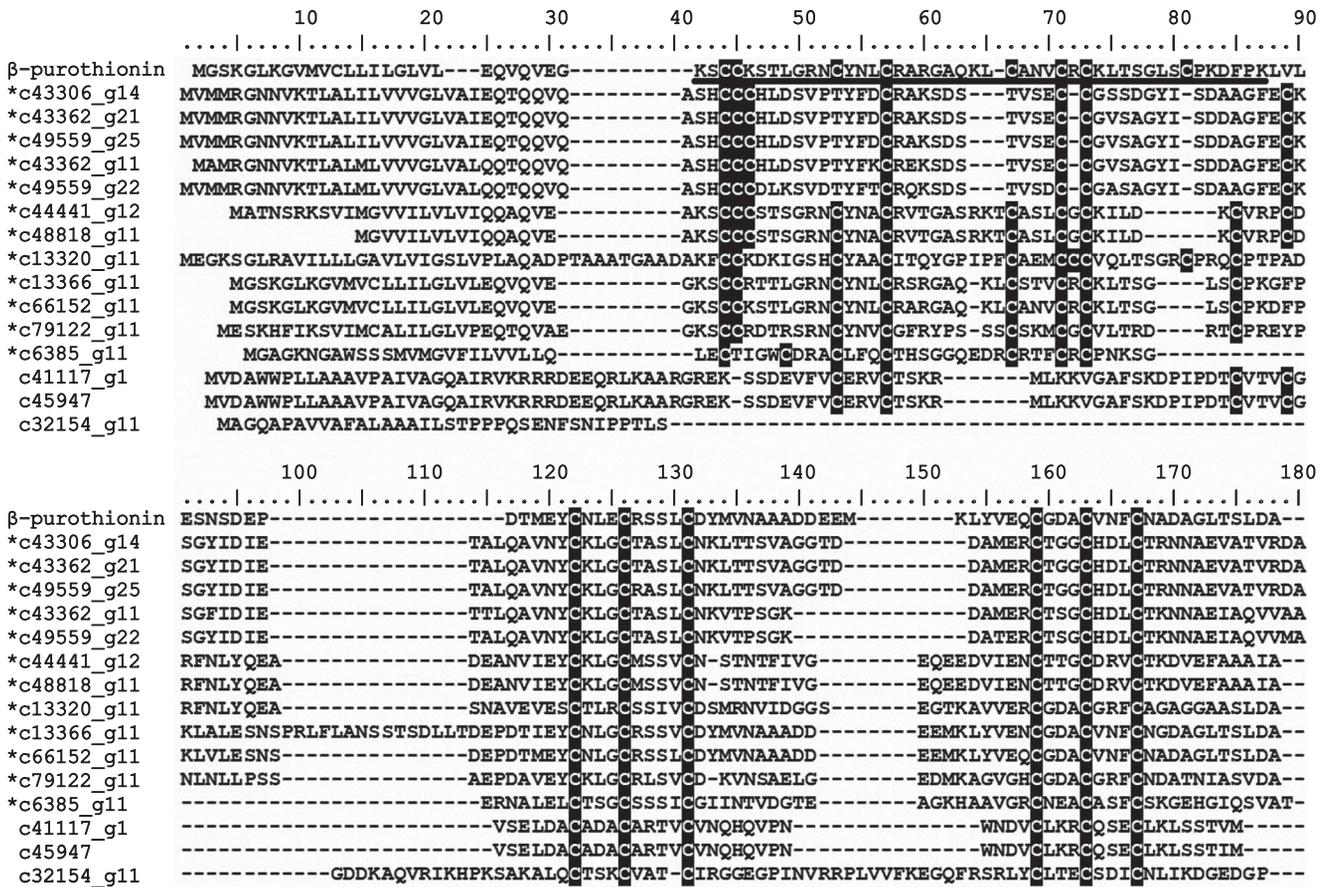


Рис. 3. Выравнивание транслированных последовательностей предшественников тионинов *T. kiharae*.

\* Последовательности, аннотированные как тионины и тиониноподобные белки в базе данных NCBI. В последовательности предшественника β-пурутионина (GenBank CAA65312.1) область зрелого пептида подчеркнута. Остатки цистеина выделены белым шрифтом на черном фоне.

щих предшественники с характерными для тионинов мотивами, однако лишь 4 из них аннотировались как тиониноподобные белки в базе данных NCBI (Slavokhotova et al., 2015). У шести гипотетических тионинов, как и у типичных тионинов, шесть или восемь остатков цистеина в молекуле и два расположенных подряд остатка цистеина в N-концевой области. У остальных пептидов число остатков цистеина варьировало от 5 до 14. Заслуживает внимания факт, что тиониноподобные белки колосняка песчаного с тремя расположенными подряд остатками цистеина в N-концевой области молекулы сходны по аминокислотной последовательности с таковыми пшеницы.

Таким образом, транскриптомный анализ выявил новые структурные типы тиониноподобных белков у пшеницы и родственного вида злаков – колосняка. Дальнейшие исследования будут направлены на анализ антимикробной активности этих новых пептидов растений.

### Взаимосвязь между структурой и функцией тионинов

К настоящему времени ряд тионинов выделен и охарактеризован, что позволило провести исследования роли отдельных аминокислотных остатков в пространственной структуре пептидов и их биологической активности. Исследования пурутионина пшеницы показали, что модификация всех аминокислотных групп, существенно меняющая

заряд молекулы, обуславливает потерю токсичности для клеток дрожжей и мышей. Модификация единственного консервативного остатка тирозина (Tyr-13) также значительно снижает токсичность. Полученные результаты свидетельствуют о важности положительно заряженных групп лизина во взаимодействии с отрицательно заряженной поверхностью клеток-мишеней, а также остатка тирозина в положении 13 для проявления тионином пшеницы токсичных свойств (Wada et al., 1982). Сравнение аминокислотных последовательностей различных тионинов показало, что помимо остатков цистеина ряд других аминокислотных остатков, таких как остатки 1, 2, 9-14, включая Tyr-13, которые «выстилают» щель между двумя структурными доменами пептида, высоко консервативны, что дало основание предположить их важность для функционирования тионинов. Исходя из пространственной структуры тионинов, было высказано предположение, что эта консервативная область связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран и вытесняет их, что приводит к солубилизации и лизису мембран (Stec et al., 2004). Был синтезирован нанопептид, соответствующий последовательности тионина *Pyricularia pubera* с 7-го по 15-й аминокислотный остаток, в котором остаток Cys-12 заменен на серин. Этот пептид, предположительно, является активным сайтом тионина. Было установлено, что он связывается с «рецепторным

сайтом» – фосфатидилсеринем фосфолипидной мембраны, но менее прочно, чем нативный тионин (Osórgo e Castro, Vernon, 2003). Остатки Lys-1 и Arg-10 составляют фосфат-связывающий сайт, в то время как остатки Ser-2 и Tyr-13 образуют глицерин-связывающий сайт. Остатки Asn-11 и Asn-14 стабилизируют образование гомодимера за счет межмолекулярных водородных связей (Oard et al., 2007). L.P. Vernon с коллегами (1985) считает, что положение 8, Trp-8 в тионине *Pyrularia*, также важно для антимикробной активности.

Сравнение последовательностей токсичных тионинов с нетоксичным крамбином *C. abyssinica* показало, что остатками, решающими для проявления токсичных свойств, служат консервативные остатки Lys-1 и Tyr-13, поскольку у крамбина в аналогичных положениях расположены остатки Thr-1 и Phe-13. Кроме того, остаток Arg-10 считается важным для поддержания пространственной структуры тионинов (Rao et al., 1993).

На примере тионина Pp-TH *P. pubera* с четырьмя дисульфидными связями было показано, что удаление одной дисульфидной связи приводит к существенному изменению фолдинга пептида (Vila-Perelló, Andreu, 2005). Был синтезирован укороченный на 45 % Pp-TH, состоящий из остатков 7–32, которые образуют две антипараллельные  $\alpha$ -спирали, стабилизированные двумя дисульфидными связями. Оказалось, что этот укороченный пептид сохраняет такую же антимикробную активность по отношению к ряду микроорганизмов и механизм действия, как и интактный Pp-TH (Vila-Perelló et al., 2005). Кроме того, у тионина Pp-TH *P. pubera* в положении 32 расположен остаток аспарагиновой кислоты Asp-32 вместо Arg-32, характерного для других 8-Cys тионинов. Чтобы понять роль этой мутации, был получен аналог тионина Pp-TH(D32R) с заменой аспарагиновой кислоты на аргинин. Установлено, что при этом структура модифицированного пептида в целом сохранялась, хотя отмечалось некоторое уменьшение содержания  $\alpha$ -спиралей. В то же время такой пептид обладал более высокой ингибирующей активностью против ряда грамтрицательных бактерий при том, что активность против других патогенов оставалась неизменной (Vila-Perelló et al., 2003). Тионин *P. pubera* был использован в качестве матрицы для создания более коротких, но таких же активных, как и нативный пептид, антимикробных соединений (Vila-Perelló et al., 2006).

#### Биологическая активность тионинов

Способность тионинов ингибировать рост бактерий и грибов *in vitro* известна давно (Stuart, Harris, 1942). R. Fernandez de Caleya с коллегами (1972) впервые показал, что тионины подавляют рост фитопатогенных бактерий, и выдвинул предположение о защитной роли этих белков *in planta*. Последующие исследования выявили, что тионины ингибируют рост как грамположительных, так и грамтрицательных бактерий, а также ряд фитопатогенных грибов и оомицетов, причем IC<sub>50</sub> (концентрация, необходимая для 50 % ингибирования роста патогена) обычно составляет от 1 до 15 мкг/мл (Stec, 2006). Так, для тионинов пшеницы и ячменя, относящихся к тионинам класса I, эффективная концентрация, дающая 50 % ингибирование роста бактерий *Clavibacter michiganensis*

subsp. *sepedonicus* и *Pseudomonas solanacearum*, составляла 2–3 × 10<sup>-7</sup> М, а патогенных грибов, таких как *Rosellinia necatrix*, *Colletotrichum lagenarium* и *Fusarium solani*, – 1–4 × 10<sup>-6</sup> М (Molina et al., 1993). Пуротионин пшеницы вызывал лизис клеток патогена риса *Rhizoctonia solani* (штамм LR172), причем видимые изменения в мембране патогена наблюдались при концентрации пуротионина, равной 0.5 мкМ (Oard et al., 2004).

Интересно, что тионины способны ингибировать рост не только растительных патогенов, но и микроорганизмов, патогенных для человека и животных. Так, было показано, что тиониноподобные пептиды *Capsicum annuum* ингибируют рост клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* и *Candida tropicalis*, а также бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (Taveira et al., 2014, 2016). Кроме того, тиониноподобный пептид *C. annuum* CaThi ингибировал рост гриба *Fusarium solani*, предотвращая образование гиф. Были отмечены увеличение проницаемости мембран, индукция образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и активация каспаз. Установлено, что пептид проникал внутрь клеток патогена. При совместном применении с флюконазолом наблюдался синергизм действия двух антифунгальных агентов, в результате чего достигалась 100 % гибель клеток *F. solani* (Taveira et al., 2017). Эти авторы полагают, что тионин перца вызывает апоптоз клеток гриба; возможно, что он действует также и на внутриклеточные мишени. Тионин арабидопсиса Thi2.1 при экспрессии в эндотелиальной клеточной линии BE-E6E7 ингибировал рост *E. coli* и *Staphylococcus aureus*, в частности изолята, вызывающего мастит у коров, а также *C. albicans* (Loeza-Ángeles et al., 2008; Ochoa-Zarzosa et al., 2008a, b). Показано, что тионины пшеницы убивают клетки паразитического простейшего *Leishmania donovani*, вызывающего висцеральный лейшманиоз (Berrocal-Lobo et al., 2009). Гибель клеток паразита происходит за счет резкого увеличения проницаемости мембран. Приведенные примеры открывают возможность использования тионинов для лечения заболеваний человека и животных.

Помимо микроорганизмов, тионины действуют и на культуры клеток млекопитающих (Carrasco et al., 1981; Loeza-Ángeles et al., 2008), организм животных (млекопитающих) в целом (Coulson et al., 1942) и личинки насекомых (Kramer et al., 1979; Stec, 2006). При инъекции тионинов пшеницы, ячменя и ржи в личинки *Manduca sexta* полулетальная концентрация составляла 17–46 мкг/г веса (Kramer et al., 1979).

Тионины обладают цитотоксическим и противоопухолевым действием на клетки млекопитающих (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). Так, тионин *P. pubera* ингибирует рост клеток меланомы мыши (B16) и рака шейки матки (HeLa), при этом IC<sub>50</sub> = 50 мкг/мл. Одновременно этот тионин обладает цитотоксическим действием, вызывая гемолиз. Противоопухолевое действие связывают с деполаризацией мембран, приводящей к активации эндогенной фосфолипазы A<sub>2</sub>, в результате чего происходит изменение структуры мембран и гибель клеток. К другой группе тионинов с противоопухолевым и цитотоксическим действием относятся вискотоксины. Вискотоксин В2 подавляет рост клеток саркомы крыс с IC<sub>50</sub> = 1.6 мкг/л (Kong et al., 2004). Вискотоксины А1, А2 и А3 обладают цитотокси-

ческим действием на лимфоциты человека, что связывают с индукцией образования активных форм кислорода и увеличением проницаемости мембран. Тем не менее у вискотоксинов гемолитические свойства выражены значительно слабее, чем у других тионинов (Coulon et al., 2002). Лигатоксин В *P. leaque* при концентрации 100 мкг/мл ингибирует рост клеток лимфомы (U937GTВ) и аденокарциномы человека (ACHN). В молекуле этого тионина есть ДНК-связывающий домен. Полагают, что связывание тионина с ДНК приводит к ингибированию синтеза нуклеиновых кислот (Li et al., 2002). Все фторатоксины (А–F) обладают токсичностью для клеток млекопитающих: А и В токсичны для крыс в концентрации 0.5–1 мг/кг; С–F подавляют рост клеток различных солидных опухолей, причем фторатоксин С отличается высокой избирательной активностью в отношении клеток рака груди (Johansson et al., 2003). Тионин *A. thaliana* Thi2.1 имеет также антиканцерогенное действие: он подавляет рост клеток MCF-7 на 94 % и HeLa на 38 %. В то же время этот тионин обладает цитотоксическим действием на эндотелиальные клетки быка и эпителиальные клетки молочной железы (Loeza-Ángeles et al., 2008). Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксичность тионинов не является селективной, однако эти пептиды могут быть использованы при разработке новых противораковых препаратов.

Токсичность тионинов для различного типа клеток подтверждает их защитную роль от патогенов *in vivo*. В пользу этого говорит и целый ряд других данных, таких как синтез тионинов в ответ на действие патогенов (Bohlmann et al., 1998), локализация их в «уязвимых» тканях (Ortu et al., 1997), повышение устойчивости трансгенных растений, экспрессирующих тионины (см. ниже), а также снижение устойчивости к патогенам при сайленсинге генов тионинов (Rayapuram et al., 2008). Так, в частности, исследования транскриптома ячменя при заражении тлей *Rhopalosiphum padi*, *Myzus persicae* и *Myzus cerasi* выявили усиление экспрессии нескольких генов тионинов, особенно при инфицировании *M. persicae*, и в меньшей степени при заражении *R. padi*. Эктопическая экспрессия двух из этих генов в *Nicotiana benthamiana* снижала чувствительность к *M. persicae*, что указывало на то, что тионины участвуют в защите от тли (Escudero-Martinez et al., 2017). В то же время сайленсинг генов тионинов приводит к ослаблению устойчивости. Так, было показано, что при сайленсинге гена тионина растения *Nicotiana attenuata* в большей степени, чем растения табака дикого типа, поражаются оппортунистическими видами *Pseudomonas* и грибами от инфекции (Rayapuram et al., 2008).

Высокая токсичность тионинов по отношению к различным патогенам и клеткам насекомых и млекопитающих открывает перспективы их практического использования для создания на их основе биологически активных структурно более простых аналогов при разработке новых антимикробных соединений (Vila-Perelló et al., 2006).

Хотя основная роль тионинов состоит в защите от патогенов, они служат запасными белками и участвуют в таких процессах, как созревание и прорастание семян, упаковка запасных белков в белковые тела и их мобилизация при прорастании.

## Механизм действия

Считается, что токсичность тионинов связана с увеличением проницаемости мембран (Carrasco et al., 1981), которая ингибируется одно- и двухвалентными ионами металлов (Oard et al., 2007). На примере  $\alpha$ -гордотионина ячменя с использованием молекулярного моделирования был предложен механизм увеличения проницаемости мембран. Согласно представленной модели, тионин образует в мембране водный канал, что приводит к поступлению воды в липидный бислой и локальному разрушению мембраны (Oard, 2011). Вызванное тионинами изменение проницаемости мембран влечет за собой целый ряд других процессов, таких как деполяризация мембран, увеличение проницаемости для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^{+}$ , а также активация некоторых ферментов (Stec, 2006). Все эти вторичные процессы могут усилить первичный токсический эффект, который завершается полным разрушением клеток. Очевидно, что индуцированное тионинами увеличение проницаемости мембран основано на некоем универсальном процессе, а не связано с взаимодействием со специфическими рецепторами на поверхности клеточных мишеней. Согласно (Hughes et al., 2000), токсичность тионинов обусловлена формированием ионных каналов в клеточных мембранах путем непосредственного связывания с поверхностью липидов. J.A. Richard с коллегами (2002) считает, что тионины частично встраиваются в липидную мембрану за счет электростатических взаимодействий, что приводит к повышению жесткости мембран и увеличению текучести по краям межфазных участков. Образованию отрицательно заряженных участков, состоящих из фосфолипидов, способствует электростатическое взаимодействие между тионинами и отдельными группами молекул фосфолипидов. Эти участки, образованные токсинами, увеличивают текучесть мембран и вытесняют из них фосфолипиды, следствием чего становится усиление нестабильности мембран и необратимый лизис клеток (Stec et al., 2004).

Помимо увеличения проницаемости мембраны, тионины действуют и на внутриклеточные мишени: активируют эндогенную фосфолипазу  $A_2$  (Vernon, Bell, 1992) и аденилатциклазу (Huang et al., 1994).  $\beta$ -пуротионин ингибирует протеинкиназу С и связывается с кальмодулином. Кроме того, пуротионины ингибируют рибонуклеотидредуктазу и  $\beta$ -глюкуронидазу (Diaz et al., 1992). Предполагают, что вискотоксины могут непосредственно взаимодействовать с ДНК или РНК и ингибировать синтез нуклеиновых кислот и белка (Woynarowski, Konopa, 1980; Li et al., 2002); показано, что они обладают иммуномодулирующим действием (Tabiasco et al., 2002). Все обнаруженные у тионинов токсические свойства, начиная с разрушения мембран, затрагивают ключевые процессы в клетке, что в конечном итоге может привести к их гибели. Появляются данные о том, что тионины действуют не только на внутриклеточные мишени, но и на секретируемые белки патогенов. Так, исследование механизма действия антифунгального тионина *A. thaliana* Thi2.4 показало, что он связывается с секретируемым лектином *Fusarium graminearum*, который вызывает гибель клеток листьев, таким образом защищая растение от токсического действия лектина (Asano et al., 2013).

### Использование генов тионинов для повышения устойчивости растений к болезням

Гены тионинов с успехом применяли для трансформации растений и получения трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью как к бактериальным, так и грибным патогенам. В большинстве случаев в качестве трансгена использовали гены тионинов злаков. Остановимся на нескольких примерах.

Ген  $\beta$ -пурутионина пшеницы под контролем эндогенного промотора карбоангидразы был встроен в геном *A. thaliana* (Oard, Enright, 2006). Хотя в трансгенных растениях не происходила гиперэкспрессия гена  $\beta$ -пурутионина, они обладали повышенной устойчивостью к бактериальным и грибным патогенам – *Pseudomonas syringae* (штамм DC3000) и *F. oxysporum*. Экспрессия  $\beta$ -пурутионина в трансгенных растениях вызывала аномалии морфологии гиф гриба, а экстракт листьев трансгенных растений увеличивал проницаемость мембран у гриба *R. solani*.

Экспрессия гена  $\alpha$ -тионина ячменя под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в растениях табака приводила к увеличению устойчивости к двум бактериальным патогенам – *P. syringae* pv. *tabaci* и *P. syringae* pv. *syringae* (Carmona et al., 1993).

Черная гниль батата, вызванная грибом *Ceratocystis fimbriata*, представляет существенную проблему для тропических и субтропических районов земного шара, где выращивается батат, особенно для таких стран, как Индия, КНР и Индонезия. Патогенный гриб тормозит рост растений и отрицательно влияет на хранение клубней. Были созданы трансгенные растения батата со встроенным геном  $\alpha$ -гордотионина ячменя и показан высокий уровень экспрессии мРНК  $\alpha$ -гордотионина в листьях и клубнях трансгенных растений. По сравнению с нетрансгенными у трансгенных растений при инфекции *C. fimbriata* в меньшей степени желтели листья, и зоны некроза вокруг сайтов инокуляции спорами гриба также были меньше, чем у исходных нетрансформированных растений. Эти результаты свидетельствуют о перспективности использования генов тионинов для повышения устойчивости батата к черной гнили (Muramoto et al., 2012).

Ген тионина риса OsTH17 использовали для получения трансгенных линий риса сорта Nipponbare (Ji et al., 2015). Трансгенные растения обладали меньшей чувствительностью к оомицету *Pythium graminicola* и нематоду *Meloidogyne graminicola*, – двум наиболее вредоносным патогенам, поражающим корни риса. Основные бактериальные патогены риса – *Burkholderia plantarii* и *Burkholderia glumae* – также представляют большую проблему при выращивании риса. Гены эндогенных тионинов конститутивно экспрессируются в coleoptile, который является органом-мишенью для бактерий. Однако экспрессии эндогенных генов тионинов недостаточно для устойчивости к этим патогенам. В связи с этой проблемой были созданы трансгенные растения риса с геном тионина овса, который накапливался в значительных количествах в клеточных стенках. При проращивании семян нетрансгенных растений риса в присутствии патогена проростки быстро желтели и погибали, чего не происходило с трансгенными растениями риса, в которых экспрессировался ген тионина клеточных стенок овса. Таким образом, этот

тионин эффективно защищал растения риса от бактериальной инфекции (Iwai et al., 2002).

Ген  $\alpha$ -гордотионина ячменя был использован для трансформации яблонь (Krens et al., 2011). Четыре из шести полученных трансгенных линий оказались значительно более устойчивы к грибному патогену *Venturia inaequalis*, вызывающему паршу яблонь, в полевых условиях, причем этот признак сохранялся в течение четырех лет наблюдений. Экспрессия гена гордотионина у трансгенных растений также сохранялась на постоянном уровне.

Ген тионина арабидопсиса Thi2.1 под контролем неактивного в плодах промотора использовали для получения трансгенных растений томата, устойчивых к бактериальному и фузариозному вилту. Была достигнута конститутивная экспрессия трансгена в корнях и листьях растений томата. Трансгенные растения оказались более устойчивыми, чем не трансгенные к бактериальному и фузариозному вилту. Проведенные исследования показали, что в трансгенных линиях подавлена репликация бактериального патогена (Chan et al., 2005). Этот же ген тионина арабидопсиса был использован для повышения устойчивости чувствительного экотипа Columbia (Col-2) *A. thaliana* к заражению *F. oxysporum* f. sp. *matthiolaе*. О повышении устойчивости свидетельствовало подавление роста гриба на трансгенных растениях; более того, наблюдались аномалии роста гиф, проявлявшиеся, в частности, в виде гиперветвления (Epple et al., 1997).

В заключение следует отметить, что, хотя тионины известны уже давно, высокая токсичность этих пептидов в отношении широкого круга бактерий и грибов, патогенных для растений и человека, а также насекомых и опухолевых клеток человека, делает их молекулы чрезвычайно перспективными для разработки новых лекарственных препаратов и средств борьбы с болезнями растений. Детальные исследования механизмов действия тионинов позволят создать на их основе новые соединения с улучшенными свойствами, которые найдут применение в сельском хозяйстве и медицине.

### Благодарности

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-16-00032).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

- Asano T., Miwa A., Maeda K., Kimura M., Nishiuchi T. The secreted antifungal protein thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* suppresses the toxicity of a fungal fruit body lectin from *Fusarium graminearum*. PLoS Pathog. 2013;9(8):e1003581. DOI 10.1371/journal.ppat.1003581.
- Balls A.K., Hale W.S., Harris T.H. A crystalline protein from a lipoprotein of wheat flour. Cereal Chem. 1942;19:279-288.
- Berrolcal-Lobo M., Molina A., Rodriguez-Palenzuela P., Garcia-Olmedo F., Rivas L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. Exp. Parasitol. 2009;122: 247-249.
- Bohlmann H. The role of thionins in plant protection. Crit. Rev. Plant Sci. 1994;13:1-16.
- Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K. Wounding and chemicals induce expression of the Arabi-

- dopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett. 1998;437(3):281-286.
- Carmona M.J., Molina A., Fernandez J.A., Lopez-Fando J.J., Garcia-Olmedo F. Expression of the  $\alpha$ -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J. 1993; 3(3):457-462.
- Carrasco I., Vazquez D., Hernandez-Lucas C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. Eur. J. Biochem. 1981;116(1): 185-189.
- Castagnaro A., Marañón C., Carbonero P., García-Olmedo F. Extreme divergence of a novel wheat thionin generated by a mutational burst specifically affecting the mature protein domain of the precursor. J. Mol. Biol. 1992;224(4):1003-1009.
- Chan Y.L., Prasad V., Sanjaya, Chen K.H., Liu P.C., Chan M.T., Cheng C.P. Transgenic tomato plants expressing an *Arabidopsis* thionin (*Thi2.1*) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. Planta. 2005;221(3):386-393. DOI 10.1007/s00425-004-1459-3.
- Coulon A., Berkane E., Sautereau A.M., Urech K., Rouge P., Lopez A. Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: viscotoxin A3. Biochim. Biophys. Acta. 2002;1559(2):145-159. DOI 10.1016/S0005-2736(01)00446-1.
- Coulson E.J., Harris T.H., Axelrod B. Effect on small laboratory animals of the injection of the crystalline hydrochloride of a sulfur protein from wheat flour. Cereal Chem. 1942;19:301-307.
- de Souza Cândido E., e Silva Cardoso M.H., Sousa D.A., Viana J.C., de Oliveira-Júnior N.G., Miranda V., Franco O.L. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. Peptides. 2014;55:65-78. DOI 10.1016/j.peptides.2014.02.003.
- Díaz I., Carmona M.J., García-Olmedo F. Effects of thionins on beta-glucuronidase *in vitro* and in plant protoplasts. FEBS Lett. 1992; 296(3):279-282. DOI 10.1016/0014-5793(92)80304-Y.
- Egorov T.A., Odintsova T.I. Defense peptides of plant immune system. Russ. J. Bioorg. Khim. 2012;38(1):1-9. DOI 10.1134/S1068162012010062.
- Epple P., Apel K., Bohlmann H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell. 1997;9(4):509-520. DOI 10.1105/tpc.9.4.509.
- Escudero-Martínez C.M., Morris J.A., Hedley P.E., Bos J.I.B. Barley transcriptome analyses upon interaction with different aphid species identify thionins contributing to resistance. Plant Cell Environ. 2017;40(11):2628-2643. DOI 10.1111/pce.12979.
- Fernández de Caleyá R., González-Pascual B., García-Olmedo F., Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. Appl. Microbiol. 1972;23(5):998-1000.
- Guzmán-Rodríguez J.J., Ochoa-Zarzosa A., López-Gómez R., López-Meza J.E. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. Biomed. Res. Int. 2015;2015:735087. DOI 10.1155/2015/735087.
- Huang W., Vernon L.P., Bell J.D. Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cell membranes by the toxin thionin from *Pyricularia pubera*. Toxicon. 1994;32(7):789-797.
- Hughes P., Dennis E., Whitecross M., Llewellyn D., Gage P. The cytotoxic plant protein,  $\beta$ -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. J. Biol. Chem. 2000;275(2):823-827. DOI 10.1074/jbc.275.2.823.
- Iwai T., Kaku H., Honkura R., Nakamura S., Ochiai H., Sasaki T., Ohashi Y. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. Mol. Plant Microbe Interact. 2002;15(6):515-521. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.6.515.
- Ji H., Gheysen G., Ullah C., Verbeek R., Shang C., De Vleeschauwer D., Höfte M., Kyndt T. The role of thionins in rice defence against root pathogens. Mol. Plant Pathol. 2015;16(8):870-881. DOI 10.1111/mpp.12246.
- Johansson S., Gullbo J., Lindholm P., Ek B., Thunberg E., Samuelsson G., Larsson R., Bohlin L., Claeson P. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. Cell. Mol. Life Sci. 2003; 60(1):165-175. DOI 10.1007/s000180300011.
- Kong J.L., Du X.B., Fan C.X., Xu J.F., Zheng X.J. Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity. Acta Pharmaceutica Sinica. 2004;39(10):813-817.
- Kramer K.J., Klassen L.W., Jones B.L., Speirs R.D., Kammer A.E. Toxicity of purothionin and its homologues to the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). Toxicol. Appl. Pharmacol. 1979;48:179-183.
- Krens F.A., Schaart J.G., Groenwold R., Walraven A.E.J., Hesselink T., Thissen J.T.N.M. Performance and long-term stability of the barley hordeothionin gene in multiple transgenic apple lines. Transgenic Res. 2011;20:1113-1123. DOI 10.1007/s11248-011-9484-z.
- Li S.-S., Gullbo J., Lindholm P., Larsson R., Thunberg E., Samuelsson G., Bohlin L., Claeson P. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. Biochem. J. 2002;366(2):405-413. DOI 10.1042/bj20020221.
- Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. Biotechnol. Lett. 2008; 30(10):1713-1719. DOI 10.1007/s10529-008-9756-8.
- Molina A., Goy P.A., Fraile A., Sanchez-Monge R., Garcia-Olmedo F. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. Plant Sci. 1993;92:169-177.
- Muramoto N., Tanaka T., Shimamura T., Mitsukawa N., Hori E., Koda K., Otani M., Hirai M., Nakamura K., Imaeda T. Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. Plant Cell Rep. 2012;31(6):987-997. DOI 10.1007/s00299-011-1217-5.
- Oard S.V. Deciphering a mechanism of membrane permeabilization by  $\alpha$ -hordeothionin peptide. Biochim. Biophys. Acta. 2011;1808(6): 1737-1745. DOI 10.1016/j.bbamem.2011.02.003.
- Oard S.V., Enright F.M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Cell Rep. 2006;25(6):561-572. DOI 10.1007/s00299-005-0102-5.
- Oard S., Karki B., Enright F. Is there a difference in metal ion-based inhibition between members of thionin family: molecular dynamics simulation study. Biophys. Chem. 2007;130(1-2):65-75. DOI 10.1016/j.bpc.2007.07.005.
- Oard S., Rush M.C., Oard J.H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. J. Appl. Microbiol. 2004;97(1):169-180. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Angeles H., Sagrero-Cisneros E., Villagómez-Gómez E., Lara-Zárate L., López-Meza J.E. Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 2008a;127(3-4):425-430. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.08.031.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Lara P.D., Torres-Rodríguez F., Loeza-Angeles H., Mascot-Chiquito N., Sánchez-Baca S., López-Meza J.E. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008b;94(2):199-206. DOI 10.1007/s10482-008-9230-6.
- Orru S., Scaloni A., Giannattasio M., Urech K., Pucci P., Schaller G. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. Biol. Chem. 1997; 378(9):989-996.
- Osório e Castro V.R., Vernon L.P. Stimulation of prothrombinase activity by the nonapeptide Thr-Trp-Ala-Arg-Asn-Ser-Tyr-Asn-Val, a segment of a plant thionin. Peptides. 2003;24(4):515-521. DOI 10.1016/S0196-9781(03)00115-3.
- Plattner S., Gruber C., Stadlmann J., Widmann S., Gruber C.W., Altmann F., Bohlmann H. Isolation and characterization of a thionin

- proprotein-processing enzyme from barley. *J. Biol. Chem.* 2015; 290(29):18056-18067. DOI 10.1074/jbc.M115.647859.
- Rao U., Teeter M.M. Improvement of turn structure prediction by molecular dynamics: a case study of alpha 1-purothionin. *Protein Eng.* 1993;6(8):837-847.
- Rayapuram C., Wu J., Haas C., Baldwin I.T. *PR-13/Thionin* but not *PR-1* mediates bacterial resistance in *Nicotiana attenuata* in nature, and neither influences herbivore resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008;21(7):988-1000. DOI 10.1094/MPMI-21-7-0988.
- Richard J.A., Kelly I., Marion D., Pezolet M., Auger M. Interaction between  $\beta$ -purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a  $^{31}\text{P}$ -NMR and infrared spectroscopic study. *Biophys. J.* 2002;83: 2074-2083. DOI 10.1016/S0006-3495(02)73968-4.
- Romero A., Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F. Processing of thionin precursors in barley leaves by a vacuolar proteinase. *Eur. J. Biochem.* 1997;243(1-2):202-208. DOI 10.1111/j.1432-1033.1997.0202a.x.
- Sánchez-Monge R., Delibes A., Hernández-Lucas C., Carbonero P., García-Olmedo F. Homoeologous chromosomal location of the genes encoding thionins in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 1979; 54(2):61-63. DOI 10.1007/BF00265470.
- Sarethy I.P. Plant peptides: bioactivity, opportunities and challenges. *Protein Pept. Lett.* 2017;24(2):102-108. DOI 10.2174/0929866523666161220113632.
- Schrader-Fischer G., Apel K. cDNA-derived identification of novel thionin precursors in *Viscum album* that contain highly divergent thionin domains but conserved signal and acidic polypeptide domains. *Plant Mol. Biol.* 1993;23(6):1233-1242.
- Silverstein K.A., Moskal W.A., Jr., Wu H.C., Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D., VandenBosch K.A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* 2007;51(2):262-280. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x.
- Slavokhotova A.A., Shelenkova T.I., Odintsova T.I. Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly. *Plant. Mol. Biol.* 2015;89(3):203-214. DOI 10.1007/s11103-015-0346-6.
- Stec B. Plant thionins – the structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006;63(12):1370-1385. DOI 10.1007/s00018-005-5574-5.
- Stec B., Markman O., Rao U., Heffron G., Henderson S., Vernon L.P., Brumfeld V., Teeter M.M. Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J. Pept. Res.* 2004;64(6):210-224. DOI 10.1111/j.1399-3011.2004.00187.x.
- Stotz H.U., Waller F., Wang K. Innate immunity in plants: The role of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity.* Eds. S. Hiemstra, S.A.J. Zaai. Springer, 2013;29-51.
- Stuart L.S., Harris T.H. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. *Cereal Chem.* 1942;19: 288-300.
- Tabiasco J., Pont F., Fournie J.J., Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(10):2591-2600. DOI 10.1046/j.1432-1033.2002.02932.x.
- Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8(4):711-757. DOI 10.3390/ph8040711.
- Taveira G.B., Carvalho A.O., Rodrigues R., Trindade F.G., Da Cunha M., Gomes V.M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiol.* 2016;16:12. DOI 10.1186/s12866-016-0626-6.
- Taveira G.B., Mathias L.S., da Motta O.V., Machado O.L., Rodrigues R., Carvalho A.O., Teixeira-Ferreira A., Perales J., Vasconcelos I.M., Gomes V.M. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers.* 2014;102(1):30-39. DOI 10.1002/bip.22351.
- Taveira G.B., Mello É.O., Carvalho A.O., Regente M., Pinedo M., de La Canal L., Rodrigues R., Gomes V.M. Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. *Biopolymers.* 2017;108(3). DOI 10.1002/bip.23008.
- Vernon L.P., Bell J.D. Membrane structure, toxins and phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Pharmacol. Ther.* 1992;54(3):269-295. DOI 10.1016/0163-7258(92)90003-I.
- Vernon L.P., Evett G.E., Zeikus R.D., Gray W.R. A toxic thionin from *Pyricularia pubera*: purification, properties, and amino acid sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;238(1):18-29. DOI 10.1016/0003-9861(85)90136-5.
- Vila-Perelló M., Andreu D. Characterization and structural role of disulfide bonds in a highly knotted thionin from *Pyricularia pubera*. *Biopolymers.* 2005;80(5):697-707. DOI 10.1002/bip.20270.
- Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Synthetic and structural studies on *Pyricularia pubera* thionin: a single-residue mutation enhances activity against Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 2003;536(1-3):215-219. DOI 10.1016/S0014-5793(03)00053-X.
- Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Structural dissection of a highly knotted peptide reveals minimal motif with antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* 2005;280(2): 1661-1668. DOI 10.1074/jbc.M410577200.
- Vila-Perelló M., Tognon S., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. *J. Med. Chem.* 2006;49(2):448-451. DOI 10.1021/jm050882i.
- Wada K., Ozaki Y., Matsubara H., Yoshizumi H. Studies on purothionin by chemical modifications. *J. Biochem.* 1982;91(1):257-263.
- Wojnarowski J.M., Konopa J. Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. Hoppe Seylers Z. *Physiol. Chem.* 1980;361:1535-1545.

#### ORCID ID

T.I. Odintsova [orcid.org/0000-0002-5563-9755](https://orcid.org/0000-0002-5563-9755)  
M.P. Slezina [orcid.org/0000-0003-1653-5993](https://orcid.org/0000-0003-1653-5993)  
E.A. Istomina [orcid.org/0000-0001-6426-6009](https://orcid.org/0000-0001-6426-6009)

# Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России

И.Ф. Лапочкина<sup>1</sup>✉, О.А. Баранова<sup>2</sup>, Н.Р. Гайнуллин<sup>1</sup>, Г.В. Волкова<sup>3</sup>, Е.В. Гладкова<sup>3</sup>, Е.О. Ковалева<sup>3</sup>, А.В. Осипова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», Московская область, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия

Цель настоящего исследования – создать для Нечерноземной зоны Российской Федерации конкурентоспособные прототипы сортов озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к стеблевой ржавчине на основе новых доноров устойчивости с применением молекулярных маркеров. Разработка исходного материала базировалась на использовании новых источников устойчивости к стеблевой ржавчине, выделенных из коллекции генетических ресурсов растений ВИР и коллекции «Арсенал». Для гибридизации и беккроссирования было отобрано три образца озимой пшеницы (пшенично-эгилопсно-ржаная линия 119/4-06гw, сорт Донская полукарликовая, селекционная линия GT 96/90 из Болгарии) и один образец яровой пшеницы (линия 113/00i-4 с генетическим материалом *Aegilops triuncialis*). Эти образцы были также устойчивы к популяции бурой ржавчины в Московской области и контрастно дополняли друг друга по таким хозяйственно ценным признакам, как высота растения, число дней до колошения и устойчивость к мучнистой росе. Для ускорения селекционного процесса использовался отбор генотипов по генам устойчивости с помощью молекулярных маркеров. В результате были созданы линии озимой мягкой пшеницы, несущие комплекс хозяйственно ценных признаков и от двух до четырех генов устойчивости к стеблевой ржавчине в гомозиготном состоянии. Спектр сочетания генов полученных линий отличается от сочетаний генов, взятых в гибридизацию родительских образцов, и связан с направленною проводимых отборов методом маркер-вспомогательной селекции. У линий озимой пшеницы обнаружено 20 различных комбинаций сочетания генов *Sr2*, *Sr22*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40* и *Sr47*. Чаще всего встречалось сочетание генов *Sr22* и *Sr32* в гомозиготном состоянии. Для дальнейшего испытания в селекционных питомниках Московской области отобраны генотипы с комплексом хозяйственно ценных признаков, приближающихся к стандартному сорту озимой пшеницы Московская 39 или превышающих его. Полученный исходный материал предлагается также для использования в селекции сортов озимой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине в различных районах России. Это послужит барьером при распространении новых рас стеблевой ржавчины и повысит устойчивость создаваемых сортов к местным популяциям стеблевой ржавчины.

Ключевые слова: мягкая пшеница; маркер-вспомогательная селекция; стеблевая ржавчина; пирамида генов устойчивости.

## The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia

I.F. Lapochkina<sup>1</sup>✉, O.A. Baranova<sup>2</sup>, N.R. Gainullin<sup>1</sup>, G.V. Volkova<sup>3</sup>, E.V. Gladkova<sup>3</sup>, E.O. Kovaleva<sup>3</sup>, A.V. Osipova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Centre "Nemchinovka", Moscow region, Russia

<sup>2</sup> All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

<sup>3</sup> All-Russian Research Institute of Plant Biological Protection, Krasnodar, Russia

The aim of this research is to develop for the Russian Federation Non-Chernozem Zone competitive prototypes of winter wheat cultivars with several genes for resistance to stem rust (including race Ug99) based on new sources of resistance with the use of molecular markers. The individual plants and then lines of winter common wheat with several effective genes for resistance to race Ug99 of stem rust were selected by means of marker assisted selection out of hybrid combinations from the crossing of new donors of resistance to this dangerous disease. The development of initial material was based on the use of new sources of resistance to race Ug99 of stem rust from VIR and "Arsenal" collections. Three accessions of winter wheat (wheat-aegilops-rye line 119/4-06rw, cv. Donskaya Polukarlikovaya, line GT 96|90 from Bulgaria) and one accession of spring wheat (line 113/00i-4 with genetic material from *Aegilops triuncialis*), which supplemented and contrasted each other in such economically valuable features as plant height, number of days before heading, resistance to powdery mildew and leaf rust, were selected for hybridization and backcrossing. To accelerate the breeding process, resistant genotypes with *Sr* genes were selected with the use of molecular markers. As a result the lines of winter common wheat with a set of economically valuable features and the presence of two-four genes for resistance to stem rust in homozygote state were created. The spectrum of the stem rust gene combinations in the created lines differs from the gene combinations in the parental accessions involved in the crossing and is associated with the direction of the selections conducted by the marker assisted selection method. We discovered more

than 20 different combinations of the *Sr2*, *Sr22*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40* and *Sr47* genes in winter wheat lines. The combination of *Sr22* and *Sr32* in homozygote state was most often found. The genotypes with a set of economically valuable features approximating or surpassing the standard cultivar of winter wheat *Moskovskaya 39* were selected for further testing in breeding nurseries of the Moscow region. The developed initial material is intended for use in selection of winter wheat cultivars resistant to stem rust in different grain-sowing regions of the Russian Federation. This will serve as a barrier for spread of new races of *Puccinia graminis* and will raise the resistance of selected cultivars to local populations of stem rust.

Key words: bread wheat; marker assistant selection; stem rust; pyramid genes for resistance.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Гайнуллин Н.Р., Волкова Г.В., Гладкова Е.В., Ковалева Е.О., Осипова А.В. Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):676-684. DOI 10.18699/VJ18.410

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lapochkina I.F., Baranova O.A., Gainullin N.R., Volkova G.V., Gladkova E.V., Kovaleva E.O., Osipova A.V. The development of winter wheat lines with several genes for resistance to *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* for use in breeding programs in Russia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):676-684. DOI 10.18699/VJ18.410 (in Russian)

Ржавчинные заболевания (бурая, желтая и стеблевая ржавчины) – особо опасные болезни пшеницы, представляющие угрозу продовольственной безопасности. Стеблевая ржавчина (возбудитель – биотрофный гриб *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erik. et Henn.) наиболее вредоносна. При эпифитотийном развитии болезни потери урожая могут достигать от 50–80 % и более (Jin et al., 2008). Появление в 1999 г. в Уганде новой расы стеблевой ржавчины Ug99 и ее новых производных ставит под угрозу производство зерна пшеницы в странах, где она распространена. Усилия генетиков и селекционеров всего мира до сих пор направлены на поиск источников устойчивости к Ug99, создание доноров и сортов, устойчивых к этому опасному патогену. Занос этого заболевания возможен и на территорию России. В связи с редким (спорадическим характером) возникновения эпифитотий *P. graminis* в большинстве регионов нашей страны внимание исследователей к этому патогену до определенного времени было ослабленным. Между тем изменение климата на планете и глобализация мира могут привести к созданию условий для возникновения эпифитотийной ситуации в зерносеющих регионах Российской Федерации. В последние годы наблюдается усиление вредоносности стеблевой ржавчины: постоянное присутствие патогена отмечается на Северном Кавказе (Волкова, Синяк, 2011). Эпифитотийное развитие болезни отмечалось в 2009, 2015, 2016 гг. в Западной Сибири (Shamanin et al., 2016), Центральном регионе европейской части Российской Федерации и Нижнем Поволжье (Sibikeev et al., 2016).

На Северном Кавказе развитию и распространению патогена способствуют благоприятные климатические условия (температура, влажность), наличие промежуточного хозяина (барбариса), повсеместно распространены дикорастущие злаки, на которых грибок способен выживать, возделывание восприимчивых сортов растения-хозяина и занос инфекции. Подавляющее большинство известных генов устойчивости не эффективны против возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы. Исследователями отмечается, что северокавказские популяции ржавчинных грибов

характеризуются высокой вирулентностью и широким разнообразием патотипов. В популяции стеблевой ржавчины встречаются патотипы с 24 генами вирулентности из 39 изученных (Волкова и др., 2015, 2016).

В Западной Сибири, где производится 20 % валового производства зерна России, отмечается ухудшение фитопатологической обстановки, связанной с возделыванием восприимчивых сортов пшеницы и появлением агрессивных рас патогенов. К местной популяции *P. graminis* устойчивы сорта Pavon 76 и Buck Buck с генами (*Sr2*+*Sr23*), Super Seri (*Sr25*), Seri 82 (*Sr31*), Cook (*Sr36*) и линии MEDEA AP9D-SRDP-2 и Мороссо с неустановленными генами устойчивости, которые рекомендуются в качестве доноров в селекционных программах на иммунитет (Шаманин и др., 2016).

На территории Южного Урала периодически складываются благоприятные условия (например, в 2001 и 2005 гг.) для развития стеблевой ржавчины. При сильном развитии болезни недобор урожая может достигать 60–70 % (Мухитов, 2011). В регионы Южного Урала и Западной Сибири занос спор гриба может происходить с Северного Казахстана, где зафиксированы сильно вирулентные патотипы (TFK/R, TKT/C, TPS/H, TKN/RS, TDT/HS, TTH/KQ) стеблевой ржавчины, сходные с патотипом Ug99 (ТТКС) (Рсалиев, 2008). В то же время в 2016 г. в Западной Сибири наряду с другими агрессивными расами патогена была выявлена раса ТТТТF ([http://wheatrust.org/fileadmin/www.grcc.au.dk/International\\_Services/Pathotype\\_SR\\_Results/Country\\_report\\_Russia\\_-\\_August2017.pdf](http://wheatrust.org/fileadmin/www.grcc.au.dk/International_Services/Pathotype_SR_Results/Country_report_Russia_-_August2017.pdf)).

В Нечерноземной зоне Российской Федерации эпифитотийного развития болезни не наблюдали более 27 лет. Однако в 2010 г. вновь была зафиксирована вспышка заболевания, которая повторилась в 2013 г., а затем в 2016 г. на посевах яровой и озимой пшеницы.

Создание исходного материала и сортов с устойчивостью к стеблевой ржавчине является актуальной задачей для России. Такие сорта озимой пшеницы отсутствуют в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию в Нечерноземной зоне Рос-

сийской Федерации, а устойчивые сорта, рекомендованные к возделыванию в других регионах, защищены в основном генами *Sr31* и *Sr25*.

Большинство современных сортов не устойчиво к возбудителю стеблевой ржавчины. При создании сортов с длительной устойчивостью к ржавчинным грибам применяются общепринятой стратегии, включающей комбинацию нескольких генов устойчивости в одном генотипе (это уменьшает вероятность возникновения новых мутантных рас) и использование APR-генов, таких как *Sr2*, *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* и т. п. (Singh et al., 2011; Fetch, 2014; Bhavani, 2015).

Применение надежной маркерной системы к генам устойчивости позволяет значительно ускорить отбор растений с нужными генотипами. В настоящее время к большинству генов устойчивости подобраны молекулярные маркеры (<http://maswheat.ucdavis.edu/Index.htm>), часть из которых используется в маркер-вспомогательной селекции (marker assisted selection – MAS). Применение молекулярно-генетических маркеров позволяет идентифицировать эффективные гены устойчивости в сортах и гибридах, что ускоряет отбор нужных генотипов и повышает эффективность селекционного процесса (Кохметова, Атишова, 2012; Letta et al., 2013). К настоящему времени маркировано около 77 *Lr*-генов и 50 *Sr*-генов. Молекулярные маркеры используются в основном для генотипирования растительного материала, интрогрессии и пирамидирования районов хромосом, содержащих локусы хозяйственно важных признаков, контролируемых главными генами (Miedaner, Korzun, 2012; Леонова, 2013).

Таким образом, быстрое и успешное создание сортов с несколькими генами устойчивости зависит от наличия доноров устойчивости к болезни и специфичных молекулярных маркеров к генам устойчивости. При этом донор должен отвечать определенным требованиям: нести необходимый ген устойчивости и не снижать значительно продуктивность и адаптивность создаваемого исходного материала. Возделывание таких сортов позволит противостоять распространению новых рас патогена.

С учетом вредоносности стеблевой ржавчины и успешного выделения нами новых доноров устойчивости к расе

Ug99 стеблевой ржавчины (Баранова и др., 2015) возникла цель нашего исследования – создать линии озимой пшеницы с различными новыми сочетаниями нескольких генов устойчивости к стеблевой ржавчине для использования в селекционных программах России.

## Материалы и методы

Для работы были отобраны два образца озимой пшеницы из коллекции ВИР: сорт Донская полукарликовая и селекционная линия из Болгарии GT 96/90, имеющие в родословной чужеродный материал от *Aegilops squarrosa* и *Triticum miguschovae* соответственно. Из коллекции «Арсенал» отобран озимый трехродовой гибрид (*T. aestivum/Ae. speltooides/Secale cereale*) – 119/4-06gw и один образец яровой пшеницы – 113/00i-4 с генетическим материалом *Ae. triuncialis* (Lapochkina, 1998). Образцы различались по сочетанию генов устойчивости к стеблевой ржавчине, как было показано в работе (Баранова и др., 2015). Образцы контрастно дополняли друг друга по хозяйственно ценным признакам (табл. 1).

Первые скрещивания родительских генотипов проведены в условиях теплицы в 2011 г. Из-за несовпадения сроков цветения удалось провести гибридизацию только между следующими образцами: (113/00i-4 × GT 96/90), (GT 96/90 × 113/00i-4), (119/4-06gw × GT 96/90), (119/4-06gw × 113/00i-4), (113/00i-4 × 119/4-06gw). Так как популяции от скрещивания озимых образцов с яровой линией 113/00i-4 должны расщепляться на яровые и озимые растения начиная с F<sub>2</sub>, то потомство растений этого поколения высеивали на различных почвенных фонах.

Часть семян высеивали весной в полевых условиях, в которых яровые генотипы выколашивались, а озимые растения оставались в фазе кущения. Особенности формирования устойчивости к стеблевой ржавчине у яровых линий мягкой пшеницы изложены в работе (Лапочкина и др., 2016). Вторую часть семян высеивали в феврале на подогретом почвенном грунте, и после появления всходов (шилец) подогрев отключали. В этом случае озимые растения проходили яровизацию в естественных условиях при пониженных температурах и естественном снежном покрове, а яровые погибали. Отбор устойчивых к бурой

**Таблица 1.** Характеристика образцов мягкой пшеницы, вовлеченных в гибридизацию, по некоторым хозяйственно ценным признакам

Образец	Идентифицированные гены устойчивости	Тип реакции к Ug99, *балл	Поражение		Высота, см	Масса зерна с колоса, г	Масса 1000 зерен, г
			бурая ржавчина, (%) / тип реакции	мучнистая роса, %			
113/00i-4 (яровой)	<i>Sr2, Sr36, Sr39, Sr40, Sr47, Sr15</i>	0; 1	0/0	1	115	1.4	41.0
119/4-06gw (озимый)	<i>Sr22, Sr32, Sr9a, Sr17, Sr19</i>	2	0/0	1	100	1.5	42.0
GT 96/90 (озимый)	<i>Sr24, Sr36, Sr40, Sr47, Sr31, Sr15, Sr17</i>	0;	0/0	30	70	1.5	42.0
Донская полукарликовая (озимая)	<i>Sr32, Sr9a, Sr17, Sr19</i>	0;	5/2	50	70	1.5	40.0

\* Тип реакции на стадии проростков.

ржавчине растений проводили в  $F_2$  на искусственном фоне бурой ржавчины, содержащем расы, характерные для естественной популяции возбудителя Московской области. Эти устойчивые растения кастрировали и опыляли рекуррентными родителями или сортом Донская полукарликовая.

Иммунологическую оценку линий на устойчивость к стеблевой ржавчине проводили в полевых условиях к природной популяции гриба в Центральном регионе, а в Краснодарском крае – на инфекционном фоне развития стеблевой ржавчины. В последнем случае в качестве инфекционного материала использовали северокавказскую популяцию *P. graminis*. В период максимального развития заболевания вели учет пораженности. Критериями оценки служили тип реакции (Stakman, Levine, 1922) и степень поражения растений по шкале, рекомендуемой СИММИТ (Roelfs et al., 1992). Структурный анализ растений выполняли по продуктивности колоса, массе 1000 зерен и высоте по 10 растениям. Достоверность различий показателей от стандартного сорта озимой пшеницы Московская 39 оценивали по результатам однофакторного дисперсионного анализа с использованием алгоритмов статистического анализа Agros 2.09, разработанных С.П. Мартыновым (1999). Содержание белка и клейковины в зерне линий определяли на инфракрасном анализаторе при температуре 21 °С. Содержание клейковины в муке и ее качество анализировали на приборе Глютоматик.

Индивидуальные растения для идентификации генов устойчивости *Sr* отбирали в потомстве растений  $F_3$ ,  $BC_1F_2$ ,  $BC_1F_3$ ,  $BC_2F_3$ ,  $BC_3F_2$ . Контроль передачи целевых генов *Sr* осуществляли с использованием маркеров, рекомендованных для MAS (Приложение<sup>1</sup>).

## Результаты

У индивидуальных растений, отобранных из гибридной популяции, представленной семьями  $F_3$ ,  $BC_1F_2$ ,  $BC_1F_3$ ,  $BC_2F_3$ ,  $BC_3F_2$  различного происхождения, было идентифицировано восемь генов, которые по частоте встречаемости в потомстве образуют ряд  $Sr2 > Sr32 > Sr36 > Sr22 > Sr31 > Sr47 > Sr39 > Sr40$ . Спектр сочетания идентифицированных генов у растений озимой пшеницы отличался от спектра генов, определенных у линий яровой пшеницы (Лапочкина и др., 2016). Это связано с направленностью беккроссов, проводимых у озимой и яровой пшеницы. Сочетание комбинаций генов *Sr* в генотипах озимой пшеницы более разнообразно. У яровой пшеницы мы обнаружили 10 комбинаций сочетания генов устойчивости (Лапочкина и др., 2016), а у озимых линий – 20. Обнаружены растения с сочетанием генов:  $Sr2+Sr22$ ;  $Sr2+Sr32$ ;  $Sr2+Sr36$ ;  $Sr36+Sr47$ ;  $Sr31+Sr36$ ;  $Sr31+Sr47$ ;  $Sr22+Sr47$ ;  $Sr22+Sr31+Sr32$ ;  $Sr22+Sr31$ ;  $Sr22+Sr36$ ;  $Sr32+Sr47$ ;  $Sr31+Sr36+Sr47$ ;  $Sr36+Sr39+Sr47$ ;  $Sr2+Sr22+Sr36$ ;  $Sr2+Sr31+Sr36$ ;  $Sr22+Sr32+Sr40$ ;  $Sr22+Sr31+Sr36$ ;  $Sr2+Sr22+Sr32$ ;  $Sr2+Sr22+Sr32+Sr40$ . Чаще всего встречали растения с сочетанием генов  $Sr22$  и  $Sr32$  в гомозиготном состоянии (см. Приложение, рисунок). Отмечены особенности в передаче некоторых генов. В частности, не было обнаружено растений с геном *Sr24* об-

разца GT 96/90, несущего этот ген в гетерозиготном состоянии. Вторая особенность связана с геном *Sr2* (ген изначально был идентифицирован только у яровой пшеницы 113/00i-4). У более 70 % растений, устойчивых к стеблевой ржавчине и несущих ген *Sr2*, он находился в гетерозиготном состоянии.

Индивидуальные растения с идентифицированным генотипом устойчивости к стеблевой ржавчине сильно различались между собой по высоте (75–145 см), продуктивности колоса (1.0–2.7 г), массе 1000 зерен (36–60 г) и морфологическим признакам (наличие остей и наличие антоциана на органах). В 2015 г. потомство 373 индивидуальных растений (с идентифицированными генами *Sr* и отобранные по комплексу других хозяйственно ценных признаков) было высеяно для оценки устойчивости к болезням в двух географических точках: в Московской области и Краснодарском крае. Оценку поражения болезнями в Московской области проводили на естественном фоне развития, а в Краснодарском крае – на искусственном инфекционном фоне стеблевой ржавчины.

В 2016 г. в Московской области на посевах пшеницы сложились благоприятные условия для эпифитотийного развития стеблевой ржавчины. Очаг заболевания возник на озимой пшенице в фазе молочной спелости зерна, а затем перешел на посевы яровой пшеницы. Болезнь поразила стандартный сорт озимой пшеницы Московская 39 на 30–40 % с типом реакции на заражение 3–4 балла, это позволило провести четкую дифференциацию генотипов среди высеянного исходного материала по признаку устойчивости, а также оценить яровую коллекцию линий пшеницы с известными генами устойчивости *Sr* по эффективности отдельных генов в Московской области. При оценке коллекции линий с известными генами *Sr* в 2016 г. установлено, что по сравнению с 2013 г. спектр эффективных генов устойчивости к этому заболеванию сузился, что говорит о возможных мутационных процессах в популяции гриба или различных источниках возникновения эпифитотии. Если в 2013 г. эффективными были гены *Sr2*, *Sr9e*, *Sr13*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr28kt*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr44*, *SrWld1* и сочетание генов  $Sr13+Sr17$  и  $Sr31+Sr38$ , то в 2016 г. высокую устойчивость (поражение 0) или устойчивость (поражение до 1 % с типом реакции 1 балл) проявили только линии со следующими *Sr*-генами: *Sr28kt*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32* и *SrWld1*, а линии с генами *Sr9e*, *Sr17*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr33* и *Sr40* были умеренно устойчивы (поражение от 5 до 20 % с типом реакции 2 балла).

Оценка созданных линий озимой пшеницы к грибным болезням показала высокую устойчивость большинства генотипов к возбудителям бурой и стеблевой ржавчины и мучнистой росы. Восприимчивых к популяции *P. graminis* Московской области и расщепляющихся по этому признаку линий оказалось всего 14 из 373 высеянных (около 4 % генотипов). Устойчивых к *P. triticina* было еще больше (98.7 %). Линий, устойчивых к мучнистой росе с поражением до 10 % в тестируемом материале, было 147 (табл. 2). Выделено 136 линий с групповой устойчивостью к трем болезням.

Оценка 367 линий озимой пшеницы такого же происхождения в Краснодарском крае при искусственном заражении северокавказской популяцией стеблевой ржавчины

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx11.pdf>

**Таблица 2.** Результаты оценки устойчивости линий озимой пшеницы к грибным болезням на естественном фоне развития бурой, стеблевой ржавчины и мучнистой росы в Московской области (2016 г.)

Заболевание	Всего линий	Отобрано иммунных и устойчивых, шт.	Выделено восприимчивых и расщепляющихся, шт.
Бурая ржавчина	373	368	5
Стеблевая ржавчина	373	359	14
Мучнистая роса	373	147	226

позволила выделить 146 иммунных линий (поражение 0) и 22 устойчивых линии (поражение до 5 %, тип реакции 1–2 балла), т.е. 46 % линий проявили устойчивость к этому заболеванию.

При сравнении результатов, полученных в Московской области и Краснодарском крае, выделено 50 генотипов, проявивших устойчивость в обеих географически отдаленных точках испытания.

У линий, высеянных в 2015 г. в Московской области, отмечались маркерные морфологические признаки, характерные для родительских форм скрещивания (наличие антоциана на стебле, ушках листа, пыльниках; наличие остей), а также дата колошения и выравненность линий по высоте и морфотипу колоса. Только морфологически однородные номера без признаков расщепления вошли в выборку линий для проведения однофакторного дисперсионного анализа. Результаты этого анализа показали, что некоторые из линий достоверно превосходят стандартный сорт Московская 39 по продуктивности колоса. К тому же большинство линий имело более короткий стебель и не полегло. Линии формировали крупное зерно и выколашивались на один-восемь дней раньше стандарта. В условиях эпифитотийного развития стеблевой ржавчины в Московской области в 2016 г. они проявили устойчивость, в то время как сорт Московская 39 поразила на 30 %. К тому же часть линий была высоко устойчива к *Blumeria graminis* и *P. triticina*.

Из 373 линий озимой пшеницы, созданных в процессе эксперимента, для дальнейшего испытания в селекционных питомниках Московской области отобрано 137, несущих различное сочетание генов устойчивости к грибным патогенам. При отборе ориентировались, в том числе, на высоту 85–100 см, продуктивность колоса 2.0–2.5 г, массу 1 000 зерен 45–59 г. Учитывали число дней до колошения и степень устойчивости к изучаемым болезням. В эту выборку вошло 49 устойчивых генотипов, проявляющих устойчивость к бурой, стеблевой ржавчине и мучнистой росе в Московской области, и устойчивых к бурой и стеблевой ржавчине в Краснодарском крае.

В табл. 3 приведено разнообразие линий по идентифицированным генам устойчивости *Sr* и некоторым хозяйственно ценным признакам в сравнении со стандартным сортом Московская 39 в условиях Московской области.

Предварительная оценка линий по качеству зерна (содержание белка и клейковины в зерне) на инфракрасном анализаторе показала повышенное значение этих показате-

телей по сравнению с сортом Московская 39, который является эталоном качества в Нечерноземной зоне Российской Федерации. Колебание содержания белка в зерне у выделенных линий было в пределах 15.2–20.2 %, а клейковины – от 29.7 до 41.5 % (сорт Московская 39 имел 17.6 % белка и 31.4 % клейковины в зерне). Дополнительная оценка содержания клейковины в муке, проведенная на приборе Глютоматик, подтвердила высокое содержание клейковины у отобранных линий (37–61.3 %), но качество клейковины большинства линий соответствовало III классу (ИДК ед. шкалы прибора 92–114). (см. Приложение). Такая клейковина характеризуется как удовлетворительно слабая. Мука с такими показателями может быть использована в кондитерской промышленности для выпечки бисквитов и сдобного печенья (Быстров, Изосимов, 2007).

### Обсуждение

Привлекая чужеродный материал «дикарей», селекционер почти всегда сталкивается с нежелательным генетическим грузом, ухудшающим хозяйственно ценные признаки сорта. Традиционными методами селекции в СИММИТ создано несколько сортов пшеницы с устойчивостью к расе Ug99 стеблевой ржавчины (Singh et al., 2011), которые возделываются в Кении и Эфиопии, однако их продуктивность недостаточно высока. Процесс выведения таких сортов традиционными методами селекции длителен и занимает более 10 лет. Поэтому исследования в этом направлении продолжают, а поиск новых источников устойчивости и избавление от негативных признаков и свойств дикорастущих сородичей, которые привносятся с генами устойчивости, остаются решающим моментом в создании устойчивых сортов. Как правило, сообщается, что устойчивость у выделенных источников и сортообразцов, полученных с их участием, детерминирована одним или двумя генами (Кохметова, Атишова, 2012; Lopez-Vera et al., 2014). Большинство же исследователей сходятся во мнении, что в сорте для придания ему длительной устойчивости необходима пирамида из двух-трех генов, причем должны сочетаться гены устойчивости взрослого растения и гены ювенильной устойчивости (Fetch, 2014; Bhavani, 2015).

В нашем случае на создание конкурентоспособного устойчивого к стеблевой ржавчине исходного материала озимой пшеницы с использованием молекулярных маркеров потребовалось всего шесть лет. Отдельные генотипы превзошли стандартный сорт по некоторым элементам продуктивности и содержанию белка и клейковины в зерне. Наличие двух, трех и более генов устойчивости к *P. graminis* у полученных линий мягкой пшеницы (см. табл. 3), которые включают ген устойчивости взрослого растения *Sr2* в сочетании с генами ювенильной устойчивости *Sr22*, *Sr32*, *Sr39* и *Sr40*, должно предотвратить быструю эволюцию патогена по генам вирулентности и обеспечить будущим сортам длительную устойчивость. Особенную ценность нашим линиям придает наличие мало изученных по отношению к другим расам *P. graminis* и редко используемых в селекционных программах генов *Sr32*, *Sr39* и *Sr40* (Singh et al., 2011) с геном устойчивости взрослого растения *Sr2*, проявляющим эффект “slow rusting”.

**Таблица 3.** Некоторые хозяйственно ценные признаки линий с идентифицированным генотипом устойчивости к возбудителю *P. graminis*

Линия	Педигри	Ген	Дней до колошения	Высота, см	Масса зерна с колоса, г	Масса 1000 зерен, г
1-16	(113/119)/Д/Д	<i>Sr2h</i> <sup>**</sup> , 22, 47	257	90*	2.1	50.0
149-16	(113/119)/Д/Д/Д/	<i>Sr2h</i> , 22, 32	262	95	2.2	48.0
198-16	(113/96)/Д	<i>Sr31</i> , 36	268	130	1.9	52.0
167-16	(113/119)/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 22, 36	260	83*	1.7	51.0
165-16	(96/113)/Д/96	<i>Sr2h</i> , 36	263	97	2.0	47.0
6-16	(96/113)/96/96	<i>Sr36</i>	265	130	2.5	48.0
38-16	(96/113)/96/96/96	<i>Sr2h</i> , 36	264	102	1.9	47.0
30-16	(96/113)/Д/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 31, 47	260	86*	2.0	48.0
16-16	(113/119)/Д/Д/Д	<i>Sr22</i> , 32h, 36h	259	106	1.7	46.0
43-16	(113/96)/Д/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 32, 40	259	78*	1.5	48.0
48-16	(113/96)/Д/96	<i>Sr2h</i> , 32h, 36h	260	93	2.4*	51.0
54-16	(113/96)/Д/Д	<i>Sr22</i> , 31, 32h, 36h	259	99	1.9	49.0
76-16	(113/96)/Д/Д	<i>Sr2h</i> , 32	260	76*	1.4*	45.0
85-16	(113/96)/96/96	<i>Sr2h</i> , 36, 47	262	99	2.0	45.0
86-16	(113/96)/96/96	<i>Sr2h</i> , 36	263	98	2.7*	49.0
99-16	(113/96)/119/96	<i>Sr2h</i> , 36, 39, 47	264	97	1.9	54.0
326-16	(113/96)/119	<i>Sr2</i> , 32	264	135	2.1	44.0
103-16	[(119/96) × (113 × 96)]/96	<i>Sr22</i> , 36	264	95	1.8	46.0
108-16	(113/96)/96/Д	<i>Sr2h</i> , 31, 36	260	97	1.0*	40.0
128-16	(113/96)/119/119	<i>Sr2h</i> , 22, 32	261	91	1.9	61.0
138-16	(113/96)/119/96/96	<i>Sr2h</i> , 22, 32	259	98	2.2	57.0
129-16	(119/96)/Д/Д	<i>Sr22</i> , 32	261	84*	2.1	63.0
124-16	(113/96)/Д/96	<i>Sr2h</i> , 31, 32	262	115	2.3	61.0
131-16	(119/96)/Д/96/96	<i>Sr31</i> , 36, 47	263	90*	1.8	49.0
Стандартный сорт Московская 39			265	115	1.9	49.0
<sup>1</sup> НСР $p < 0.05$			–	25	0.5	***

<sup>1</sup> Наименьшая существенная разница (НСР).

\* Достоверное отклонение признака от стандарта при  $p < 0.05$ .

\*\* *h* – гетерозиготное состояние гена.

\*\*\*  $F_{\text{факт.}} < F_{\text{теор.}}$  ( $F$  – критерий Фишера).

В условиях эпифитотийного развития стеблевой ржавчины в 2016 г. при оценке коллекции из 44 яровых линий пшеницы с известными генами устойчивости *Sr* мы выявили гены, определяющие устойчивость к этому заболеванию в Нечерноземной зоне. Это гены: *Sr9*, *Sr10*, *Sr17*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr25*, *Sr28*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr40*, *SrWld1* и сочетание генов *Sr7a+Sr12+Sr6* и *Sr13+Sr17*. Однако высокую устойчивость к стеблевой ржавчине проявили только шесть генов: *Sr26* (1/1), *Sr28* (1/1), *Sr31* (1/0;1) и *Sr32* (0;), *Sr35* (1/1), *SrWld1* (1/1), а также сочетание генов *Sr7a+Sr12+Sr6* (1/1). Остальные имели поражение от 1/2 (*Sr10*) до 10/2-15/2-20/2 (*Sr13+Sr17*, *Sr9e*, *Sr17*, *Sr24*, *Sr30*, *Sr33*) и даже 30/2 (*Sr36*, *Sr40*). В созданных нами линиях

озимой пшеницы присутствуют как высокоэффективные для нашей зоны гены устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr32*, *Sr31*, *Sr2*), гены, детерминирующие умеренную устойчивость к патогену (*Sr36*, *Sr40*), а также гены *Sr22*, *Sr47*, реакцию которых мы не знаем из-за отсутствия их в наборе тестируемой коллекции. Совокупность этих генов определила устойчивость генотипов как в Нечерноземной зоне, так и на Северном Кавказе. Это позволяет предполагать селекционную ценность созданного материала для обоих регионов.

Альтернативный, но дорогостоящий способ повышения иммунитета пшеницы к расе Ug99 стеблевой ржавчины предлагается коллективом исследователей из США, Ав-

стралии и Китая. Они делают ставку на использование генов *Sr35* (*T. monococtum*) и *Sr33* (*Ae. taushii*). Ген *Sr35* перенесен в геном мягкой пшеницы от *T. monococtum*, где он сохраняет свою эффективность. Ген вызывает реакцию сверхчувствительности к ТТКСТ расе, однако растения с этим геном остаются восприимчивыми к некоторым другим расам стеблевой ржавчины. Поэтому рекомендуется дополнительно использовать ген *Sr33*, который обеспечивает умеренную устойчивость ко всем расам *P. graminis*. Предлагается объединить оба гена в геноме мягкой пшеницы или путем скрещивания и рекомбинации, или через трансформацию пшеницы с использованием генетической конструкции, включающей оба гена устойчивости (Periyannan et al., 2013; Saintenac et al., 2013; Grens, 2014). На ближайшее время запланировано создание трансгенных растений. Однако следует признать, что традиционная селекция, ускоренная использованием специфичных молекулярных маркеров, остается самым распространенным, доступным и пока наиболее эффективным способом получения генотипов пшеницы с генами устойчивости к ржавчинным болезням.

Успешное создание исходного материала мягкой пшеницы с различной пирамидой генов устойчивости в нашем случае обусловлено, в первую очередь, особенностью взятых в скрещивание образцов пшеницы, которые изначально отличались широким спектром *Sr*-генов, в том числе и эффективных генов к расе Ug99. Таким генетическим разнообразием линии обязаны наличию чужеродного генетического материала в родословной использованных доноров: *Triticum miguschovae* (*T. militinae/Aegilops tauschii*) (GT 96/90), *Ae. speltooides*, *S. cereale* (119/961rw), *Ae. squarrosa* (Донская полукарликовая), *Ae. triuncialis* и *T. kiharae* (113/00i-4), а в случае с образцами коллекции «Арсенал» – и использованию гамма-облучения пыльцы дикорастущих сородичей пшеницы. Этот подход приводит к возникновению у мягкой пшеницы множественных чужеродных транслокаций (Гайнуллин, Лапочкина, 2007). Ценность созданного исходного материала озимой пшеницы состоит в генетическом разнообразии и комбинации идентифицированных генов устойчивости к стеблевой ржавчине. На последнем этапе отбора протипа(ов) сорта(ов) предполагается верификация идентифицированных генов с использованием дополнительных маркеров. Наличие рецессивного гена устойчивости взрослого растения *Sr2* в гетерозиготном состоянии у большинства линий озимой пшеницы потребует дополнительных усилий для перевода его в гомозиготное состояние. В частности, нами запланированы эксперименты по получению дигаммоидных линий методом андрогенеза. Дополнительным достоинством некоторых линий является их устойчивость и к возбудителям бурой ржавчины и мучнистой росы.

Отобранные линии озимой мягкой пшеницы с несколькими эффективными генами *Sr* к расам стеблевой ржавчины Московской области и Краснодарского края отличаются по комбинации эффективных генов устойчивости и их числу в генотипе от генотипов устойчивости сортов мягкой пшеницы, созданных за рубежом и в России. Так, у сорта Pembina (Канада), устойчивого к Ug99, идентифицирован ген *Sr2*, у сортов из Казахстана (Э-607, Фитон 41) – ген устойчивости взрослого растения *Sr57*. Ряд сортов,

выведенных в СИММИТ и возделываемых в Афганистане, Кении, Египте и Индии, содержит комплекс генов *Sr2+* (Baghlan 09, Kakaba, Baz) или *Sr2+SrTmp* (Koshan 09, Robin) или *Sr2+Sr25* (Mugawim 09, Misr1, Misr2, NR356), который обеспечивает умеренный уровень устойчивости к Ug99 (Singh et al., 2011). Линии озимой пшеницы, созданные в Казахском научно-исследовательском институте защиты и карантина растений, имеют единичные гены устойчивости *Sr22* или *Sr24* или сочетание двух генов *Sr22+Sr36* (Кохметова, Атишова, 2012). У сортов яровой пшеницы, выведенных в Западной Сибири и Поволжье, идентифицированы единичные гены *Sr25*, *Sr31*, *Sr36* или сочетание генов *Sr25+Sr31* (Лютесценс 310-00-10, Кинельская нива), *Sr31+Sr36* (Лютесценс 23528) (Шаманин и др., 2015). Гены *Sr25* и *Sr6Ai#2* обеспечивают устойчивость к стеблевой и бурой ржавчине сортам из Самарского НИИ сельского хозяйства и НИИ Юго-Востока благодаря сцепленности с генами *Lr19* и *Lr6Ai#2* (Ауреум 753, Ауреум 757, Линия 199, Линия 610) (Shamanin et al., 2016).

Мы предлагаем скорректировать программы селекционных центров России и вовлечь созданный озимый и яровой исходный материал в скрещивания с местными адаптированными сортами для их улучшения по признаку устойчивости к стеблевой ржавчине в зонах риска распространения и возможных регионах заноса этого заболевания. Для ускоренного получения константного материала индивидуальные отборы следует проводить, начиная с третьего-четвертого поколения с определением эффективных генов устойчивости с использованием специфичных молекулярных маркеров. Такие подходы менее затратны по сравнению с созданием трансгенных форм растений мягкой пшеницы, а выведенные сорта станут барьером для распространения стеблевой ржавчины расы Ug99 в случае ее проникновения на территорию нашей страны.

## Благодарности

Исследование проведено при частичной поддержке РФФИ (проект № 13-04-00922) в 2013–2015 гг.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

- Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иорданская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):316-322. [Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):316-322. (in Russian)]
- Быстров А., Изосимов В. Взаимосвязь свойств пшеничной муки и качества мучных кондитерских изделий. Хлебопродукты. 2007; 7:42-43. [Bystrov A., Izosimov V. Relationship of the properties of wheat flour and the quality of flour confectionery. Khleboproducty = Bread Products. 2007;7:42-43. (in Russian)]
- Волкова Г.В., Кремнева О.Ю., Шумилов Ю.В., Синяк Е.В., Ваганова О.Ф., Данилова А.В., Трофимова И.А. Видовое и внутрипо-

- пуляционное разнообразие фитопатогенов озимых колосовых культур на Юге России. Современная микология в России. Матер. III Междунар. микологического форума. 2015;(5):155-156. [Volkova G.V., Kremneva O.Yu., Shumilov Yu.V., Sinyak E.V., Vaganova O.F., Danilova A.V., Trofimova I.A. Intraspecific and intrapopulation diversity of winter grain pathogens in southern Russia. Modern Mycology in Russia. Proceedings of the III Int. Mycological Forum. 2015;(5):155-156. (in Russian)]
- Волкова Г.В., Сияк Е.В. Стеблевая ржавчина пшеницы. Защита и карантин растений. 2011;11:14-16. [Volkova G.V., Sinyak E.V. Stem rust of wheat. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2011;11:14-16. (in Russian)]
- Волкова Г.В., Шумилов Ю.В., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф. Эффективность известных генов устойчивости к северокавказским популяциям возбудителей желтой, стеблевой и бурой ржавчины. Наука Кубани. 2016;(2):17-23. [Volkova G.V., Shumilov Yu.V., Gladkova E.V., Vaganova O.F. Efficiency of known genes for resistance to North Caucasian populations of yellow, stem, and brown rust agents. Nauka Kubani = Science of Kuban. 2016;(2):17-23. (in Russian)]
- Гайнуллин Н.Р., Лапочкина И.Ф. Идентификация хромосомных перестроек у образцов коллекции «Арсенал» с использованием SSR маркеров по В геному мягкой пшеницы. Тез. докл. II Вавиловской междунар. конф. «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке – состояние, проблемы, перспективы». СПб., 2007;253-254. [Gainullin N.R., Lapochkina I.F. Identification of chromosome rearrangements in accessions of the “Arsenal” collection using SSR markers for the B genome. Abstr. II Vavilov Int. Conf. “Genetic Resources of Cultivated Plants in the 21st Century: State, Problems, Perspectives”. St. Petersburg, 2007; 253-254. (in Russian)]
- Кохметова А.М., Атишова М.Н. Идентификация источников устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):132-141. [Kokhmetova A.M., Atishova M.N. Identification of sources of resistance to wheat stem rust using molecular markers. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012;2(6):486-493. DOI 10.1134/S2079059712060081]
- Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Шаманин В.П., Волкова Г.В., Гайнуллин Н.Р., Анисимова А.В., Галингер Д.Н., Лазарева Е.Н., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф. Создание исходного материала яровой мягкой пшеницы для селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), в том числе и к расе Ug99, в России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):320-328. DOI 10.18699/VJ16.167. [Lapochkina I.F., Baranova O.V., Shamanin V.P., Volkova G.V., Gainullin N.R., Anisimova A.V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E.V., Vaganova O.F. The development of initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including the Ug99 race, in Russia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):320-328. DOI 10.18699/VJ16.167. (in Russian)]
- Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(2):314-325. [Leonova I.N. Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(2):314-325. (in Russian)]
- Мартынов С.П. Статистический и биометрико-генетический анализ в растениеводстве и селекции. Пакет программ AGROS, версия 2.09. Тверь, 1999. [Martynov S.P. Statistical and biometric-genetic analysis in plant industry and breeding. Program Package AGROS, version 2.09. Tver, 1999. (in Russian)]
- Мухитов Л.А. Устойчивость сортов пшеницы оренбургской селекции к основным болезням зерновых культур в условиях лесостепи Южного Урала. Изв. Оренбург. аграр. ун-та. 2011;4(32):61-63. [Mukhitov L.A. Resistance of wheat varieties of Orenburg selection to the major grain crops diseases under the conditions of South Urals forest-steppe zone. Izvestiya Orenburgskogo Agrarnogo Universiteta = Proc. Orenburg Agrarian University. 2011;4(32):61-63. (in Russian)]
- Ралиев Ш.С. Вирулентность новых патотипов стеблевой ржавчины в Казахстане. Вторая Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». СПб., 2008; 87-90. [Rsaliev Sh.S. The virulence of new stem rust pathotypes in Kazakhstan. The Second All-Russian Conf. “Modern Problems of Immunity to Pests in Plants”. St. Petersburg, 2008;87-90. (in Russian)]
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Петуховский С.Л., Лихенко И.Е., Левшунов М.А., Салина Е.А., Потоцкая И.В., Трущенко А.Ю. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в Западной Сибири. М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Ом. гос. аграр. ун-т. Омск: ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, 2015. [Shamanin V.P., Morgunov A.I., Petukhovskiy S.L., Likhenco I.E., Levshunov M.A., Salina E.A., Pototskaya I.V., Trushchenko A.Yu. Breeding of spring soft wheat for resistance to stem rust in West Siberia. Ministry of Agriculture. Omsk Stolypin State Agrarian University, 2015. (in Russian)]
- Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Моргунов А.И., Чурсин А.С., Шепелев С.С., Пожерукова И.Е., Клевакина М.В. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в условиях южной лесостепи Западной Сибири. Матер. Междунар. науч.-практ. конф. с элементами научной школы для молодых ученых, аспирантов и студентов. Большие Вяземы, Московской области. 2016;283-288. [Shamanin V.P., Pototskaya I.V., Morgunov A.I., Chursin A.S., Shepelev S.S., Pozerukova I.E., Klevakina M.V. Breeding of spring bread wheat for resistance to stem rust in southern forest-steppe of Western Siberia. Proc. Int. Scientific and Research Conf. with Elements of School for Young Scientists and Students. Bolshie Vyazemy, Moscow oblast. 2016; 283-288. (in Russian)]
- Bhavani S. Presentation: Breeding durable adult plant resistance to stem rust in spring wheat: Progress made in a decade since the bunch of the Borlaug Global Rust Initiative.//BGRI Workshop. 2015. Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=GfWTH7lKIQs>.
- Fetch T. Surveillance of Ug99 stem rust and the search for new resistance genes, 2014. <https://www.globalrust.org/sites/default/files/fetch.pdf>
- Grens K. Putting Up Resistance. 2014. Available at: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40085/title/Putting-Up-Resistance/>
- Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T.Jr. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Dis. 2008;92:923-926.
- Lapochkina I.F. Cytogenetic and morphological features of common wheat hybrids obtained with the use of irradiated pollen of *Aegilops triuncialis* L. Rus. J. Genetics. 1998;34(9):1063-1068.
- Letta T., Maccaferri M., Badebo A., Ammar K., Ricci A., Crossa J., Tuberosa R. Searching for novel sources of field resistance to Ug99 and Ethiopian stem rust races in durum wheat via association mapping. Theor. Appl. Genet. 2013;126(5):1237-1256. DOI 10.1007/s00122-013-2050-8.
- Lopez-Vera E.E., Nelson S., Singh R.P., Basnet B.R., Haley S.D., Bhavani S., Huerta-Espino J., Xoconostle-Cazares B.G., Ruiz-Medrano R., Rouse M.N., Singh S. Resistance to stem rust Ug99 in six bread wheat cultivars maps to chromosome 6DS. Theor. Appl. Genet. 2014;127:231-239. DOI 10.1007/s00122-013-2212-8.
- Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. Phytopathology. 2012;102:560-566. DOI 10.1094/PHYTO-05-11-0157.
- Periyannan S., Moore J., Ayliffe M., Bansal U., Wang X., Huang L., Deal K., Luo M., Kong X., Bariana H., Mago R., McIntosh R., Dodds P., Dvorak J., Lagudah E. The gene *Sr33*, an ortholog of bar-

- ley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. *Science*. 2013;341(6147):786-788. DOI 10.1126/science.1239028.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. *Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. CIMMYT, Mexico, D.F., 1992.
- Saintenac C., Zhang W., Salcedo A., Rouse M.N., Trick H.N., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to Ug99 stem rust race Group. *Science*. 2013;341(6147):783-786.
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenski Y., Olivera P., Morgunov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica*. 2016;212:287-296. DOI 10.1007/s10681-016-1769-0.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Druzhin A.E., Badaeva E.D. Study of resistance to leaf and stem rust in *Triticum aestivum*-*Aegilops speltoides* lines. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016;6(4):351-356. DOI 10.1134/S2079059716040183.
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Bhavani S., Njau P., Herrera-Foessel S., Singh P.K., Singh S., Govindan V. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49:465-481. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095423.
- Stakman E.C., Levine M.N. The determination of biologic forms of *Puccinia graminis* on *Triticum* spp. *Minn. Agric. Res. Stn. Bull.* 1922;8:1-10.

---

#### ORCID ID

I.F. Lapochkina [orcid.org/0000-0002-2328-2798](https://orcid.org/0000-0002-2328-2798)

O.A. Baranova [orcid.org/0000-0001-9439-2102](https://orcid.org/0000-0001-9439-2102)

N.R. Gainullin [orcid.org/0000-0002-0970-662X](https://orcid.org/0000-0002-0970-662X)

# Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна

Т.Ю. Гагкаева<sup>1</sup>✉, А.С. Орина<sup>1</sup>, О.П. Гаврилова<sup>1</sup>, И.Б. Аблова<sup>2</sup>, Л.А. Беспалова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

<sup>2</sup> Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

По продуктивности и устойчивости к фузариозу на естественном фоне инфекции и на фоне искусственной инокуляции грибом *Fusarium graminearum* исследовали 17 сортов озимой пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко. Оценка сортов проводилась на основании показателей, описывающих различные типы устойчивости: процентное содержание фузариозных зерен, выявленных по внешним признакам и в результате микологического анализа, а также содержание ДНК грибов *Fusarium*; показатели продуктивности инокулированных растений в сравнении с неинокулированными; количество микотоксинов в зерне. На естественном фоне, согласно результатам микологического анализа, зараженность зерна грибами рода *Fusarium* была в среднем 6.1 % (0–15 %), количество ДНК *F. graminearum* варьировало в диапазоне  $(1.1–42.7) \times 10^{-5}$  нг/нг ДНК пшеницы, дезоксиниваленол (ДОН) обнаружен в 15 образцах с максимальным содержанием 420 мкг/кг, а фумонизин В<sub>1</sub> (ФВ<sub>1</sub>) не выявлен. На искусственном инфекционном фоне зараженность зерна составила 25.8 % (2–54 %), количество ДНК *F. graminearum* было значительно выше, чем в естественных условиях, и варьировало в пределах  $(4.24–49.8) \times 10^{-3}$  нг/нг. Образцы зерна всех сортов пшеницы, выращенных на искусственном инфекционном фоне *F. graminearum*, содержали ДОН в высоких количествах – от 20 255 до 79 245 мкг/кг. Выявлено значительное содержание ФВ<sub>1</sub> в диапазоне от 980 до 20 326 мкг/кг. Сорт Адель охарактеризован как высокоустойчивый к заражению грибами и накоплению микотоксинов. К относительно устойчивым относятся сорта Антонина, Лебедь, Память, а наиболее восприимчивым оказался сорт Утриш. Установлены сходство реакций устойчивости сортов пшеницы к заражению *F. graminearum* и *F. verticillioides* и существующие между грибами взаимодействия в процессе колонизации зерна.

Ключевые слова: пшеница; сорта; устойчивость; грибы; *Fusarium*; ДНК; микотоксины; инфекционный фон; количественная ПЦР.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гагкаева Т.Ю., Орина А.С., Гаврилова О.П., Аблова И.Б., Беспалова Л.А. Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):685–692. DOI 10.18699/VJ18.411

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., GavriloVA O.P., Ablova I.B., Bepalova L.A. Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):685–692. DOI 10.18699/VJ18.411

УДК 633.111:632.938.1+632.4  
Поступила в редакцию 26.03.2018  
Принята к публикации 08.07.2018  
© АВТОРЫ, 2018

✉ e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

## Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight

T.Yu. Gagkaeva<sup>1</sup>✉, A.S. Orina<sup>1</sup>, O.P. GavriloVA<sup>1</sup>, I.B. Ablova<sup>2</sup>, L.A. Bepalova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

<sup>2</sup> National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

In this study, naturally and artificially inoculated winter wheat varieties were studied with respect to their productivity and resistance to *Fusarium* head blight (FHB). We used the following set of disease assessment parameters: the percentage of visually and latent *Fusarium*-damaged grains (FDG); the DNA content of *Fusarium* fungi; the productivity of inoculated plants compared with non-inoculated plants; and the amount of mycotoxins in the grain. In case of naturally infected grains, the average FDG was found to be about 6.1 % (range of 0–15 %). The amount of DNA of *Fusarium graminearum* was found to be in the range of  $(1.1–42.7) \times 10^{-5}$  ng/ng wheat DNA. The mycotoxin deoxynivalenol (DON) was detected in 15 samples of grain from plants that were grown under natural infection. The maximum DON amount was found to be 420 µg/kg. Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) was not detected in naturally infected grain. In case of artificially inoculated plants, the average FDG was found to be 25.8 % (2–54 %). The amount of *F. graminearum* DNA was found to be significantly higher  $(4.24–49.8) \times 10^{-3}$  ng/ng than it was detected in grain of non-inoculated plants. The wheat varieties inoculated with *F. graminearum* contained DON in high amounts from 20 255 to 79 245 µg/kg. Furthermore, a significant amount of FB<sub>1</sub> was detected in all wheat varieties in the range of 980–20 326 µg/kg. Among the analysed wheat varieties, Adel was characterized to be the most resistant to fungal infection as well as to the contamination by mycotoxins. Antonina, Lebed and Pamyat varieties were classified more relatively resistant than that of other varieties, and Utrish variety was found to be the most susceptible to FHB. The similar resistance of wheat varieties against *F. graminearum* and *F. verticillioides* infection was recorded, and the interactions between the fungi during the colonization of grain were shown.

Key words: wheat; varieties; resistance; fungi; *Fusarium*; DNA; mycotoxins; artificial inoculation; quantitative PCR.

Возделывание сортов зерновых культур, устойчивых к различным биотическим и абиотическим факторам, – одно из главных направлений экологического земледелия. Создание и отбор селекционных форм растений, получение перспективных генотипов – сложная многолетняя работа коллективов ученых, результатом которой является спектр высокопродуктивных сортов, различающихся по устойчивости к тому или иному фактору внешней среды (Беспалова и др., 2012, 2017; Аблова и др., 2014). В этом случае возрастает значение выбора сортов для широкого возделывания, наиболее приспособленных к условиям региона и, в первую очередь, устойчивых к наиболее распространенным заболеваниям. Такой подход позволяет в максимальной степени использовать потенциал продуктивности сорта и, следовательно, приводит к увеличению валовых сборов качественного зерна.

Фузариоз зерна пшеницы относится к наиболее вредоносным заболеваниям на юге европейской части России (Гагкаяева и др., 2014). Некоторые виды грибов *Fusarium*, часто встречающихся на этой территории, – продуценты различных микотоксинов, способных вызывать серьезные проблемы со здоровьем животных и человека, употребляющих зерновую продукцию. Эпифитотийное развитие фузариоза пшеницы на Северном Кавказе, в том числе в Краснодарском крае, наблюдали в 1988, 1992, 1993, 2014, 2016, 2017 гг., а умеренное развитие заболевания было отмечено в 1984–1987, 1990, 1991, 1997, 1998, 2001, 2004, 2006, 2012 гг. Научные исследования и практическая работа, направленные на предотвращение значительного ухудшения качества зерна вследствие его зараженности грибами *Fusarium* и загрязнения микотоксинами, по-прежнему не теряют своей актуальности.

Гриб *F. graminearum* Schwabe – доминирующий патоген на зерне пшеницы, выращенной в Северо-Кавказском регионе, он ответственен за загрязнение зерна дезоксиэваленолом (ДОН), относящимся к группе трихотеценовых микотоксинов. К часто встречающимся в южном регионе России грибам можно также отнести *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg и *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg – представителей группы видов *Gibberella fujikuroi*, способных продуцировать микотоксины, обладающие канцерогенными свойствами – фумонизины (ФУМ). Фумонизин В<sub>1</sub> (ФВ<sub>1</sub>) составляет 70–80 % от общего состава этой группы вторичных метаболитов (Alexander et al., 2009).

Оценка сортов по устойчивости к фузариозу – сложный процесс, поскольку визуальные признаки поражения растений часто не выражены, зависят от условий окружающей среды и анатомо-морфологических особенностей растений. Кроме того, ранее показано, что устойчивость к этому заболеванию многокомпонентная, вследствие чего выделяют несколько ее типов: I и II – устойчивость к проникновению и распространению патогена по колосу; III – устойчивость зерен к заражению патогеном; IV – толерантность; V – способность к аккумуляции и/или деградации микотоксинов (Mesterhazy, 2002). Для анализа многокомпонентной устойчивости сортов к фузариозу используют различные методы, которые отличаются по трудоемкости, производительности и точности получаемых результатов.

Цель исследования – характеристика по устойчивости к фузариозу зерна сортов озимой пшеницы, выращенных в условиях естественного и искусственного инфекционных фонов. Оценку сортов проводили на основании показателей, описывающих различные типы устойчивости: III тип – процентное содержание фузариозных зерен, выявленных по внешним признакам и в результате микологического анализа, а также содержание ДНК грибов *Fusarium*; IV тип – показатели продуктивности инокулированных растений в сравнении с неинокулированными, обработанными фунгицидом; V тип – количество микотоксинов в зерне.

## Материалы и методы

**Образцы зерна.** Для исследования были выбраны 17 сортов озимой пшеницы селекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко: Адель, Алексеич, Антонина, Баграг, Безостая 100, Бригада, Васса, Велена, ГРОМ, Гурт, Курс, Лебедь, Морозко, Память, Таня, Утриш, Юка, которые выращивали в условиях естественного и искусственного инфекционных фонов в Краснодарском крае в 2016 г.

**Полевая оценка.** Сорта пшеницы возделывали без применения фунгицидов на экспериментальных делянках площадью 10 м<sup>2</sup> в условиях естественного фона инфекции по предшественнику подсолнечник, согласно стандартным методам земледелия, принятым в Национальном центре зерна им. П.П. Лукьяненко. Набор этих же сортов выращивали по предшественнику сидеральный пар на фоне их искусственной инокуляции грибом *F. graminearum*, а также в контрольном варианте без заражения и с обработкой фунгицидом. В фазу цветения, с помощью ранцевого опрыскивателя, растения обрабатывали суспензией штаммов *F. graminearum* с концентрацией (3–5) × 10<sup>6</sup> пропагул гриба в 1 мл с расходом суспензии 100 мл/м<sup>2</sup> (Аблова, Тараненко, 2004). В фазу полной спелости зерно каждого сорта убиралось индивидуально и сохранялось для дальнейшего анализа.

**Анализ продуктивности растений.** По высоте растений сорта группировали по классификации (Беспалова и др., 2017), показатели продуктивности (масса зерна с колоса главного стебля и масса 1000 зерен) оценивали с использованием шкалы (Бабаянц и др., 1988). После уборки и обмолота растений, выращенных на искусственном инфекционном фоне, в полученных образцах визуально выявляли число фузариозных зерен с явными признаками повреждения (щуплые, белесые, розовоокрашенные).

**Микологический анализ зараженности зерна.** Для оценки скрытой зараженности грибами *Fusarium* и выявления видового состава поверхность зерна каждого образца стерилизовали 5 % гипохлоритом натрия, затем отмывали стерильной водой. В чашки Петри на поверхность картофельно-сахарозной агаризованной среды раскладывали 100 поверхностно стерилизованных зерен и инкубировали при 24 °С в темноте. Через семь суток проводили учет внутренней зараженности зерна грибами: подсчитывали их численность и определяли видовую принадлежность (Gerlach, Nirenberg, 1982).

**Молекулярно-генетический анализ зараженности зерна.** Зерно каждого образца (20 г) гомогенизировали в стерильных размольных стаканах на мельнице Tube Mill

**Таблица 1.** Молекулярные праймеры и пробы, использованные в исследовании

Целевой объект	Название праймеров и проб	Нуклеотидные последовательности (5'→3')	Литературный источник
Пшеница	Hor1,f	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC	Nicolaisen et al., 2009
	Hor2,r	GGCCCTGTACCAGTCAAGGT	
<i>F. graminearum</i>	TMFg12,f	CTCCGATATGTTGCGTCAA	Yli-Mattila et al., 2008
	TMFg12,r	CGAAGCATATCCAGATCATCCA	
	TMFg12,p	FAM-TGAGAATGTCTTGAGGCAATGCGAACTTT-BHQ1	
Tri- <i>Fusarium</i> *	TMTrif	CAGCAGMTRCTCAAGGTAGACCC	Halstensen et al., 2006
	TMTrir	AACTGTAYACRACCATGCCAAC	
	TMTrip	Cy5-AGCTTGGTGTGGGATCTGTCTTACCG-BHQ2	
Fum- <i>Fusarium</i> *	fum1_fw	ATGCAAGAGGCGAGGCAA	Preiser et al., 2015
	fum1_rev	GGCTCTCAGAGCTTGGCAT	
	fum1_probe	Cy5-CAATGCCATCTTCTTGAACCT-BHQ2	

\* Tri-*Fusarium* и Fum-*Fusarium* – виды грибов, способные образовывать трихотеценовые микотоксины или фумонизины соответственно.

Control (ИКА). Выделение общей ДНК из 200 мг муки, а также ДНК из мицелия штаммов грибов *F. graminearum* и *F. verticillioides* проводили с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Содержание ДНК пшеницы в выделенном образце общей ДНК определяли с помощью количественной ПЦР (кПЦР) с красителем SYBR Green. Методом кПЦР с пробами TaqMan оценивали содержание ДНК грибов. Выявляли количество ДНК *F. graminearum*, а также ДНК видов грибов, способных продуцировать трихотеценовые микотоксины (Tri-*Fusarium*) и ДНК видов *Fusarium*, продуцирующих фумонизины (Fum-*Fusarium*). Последовательности праймеров, проб для кПЦР представлены в табл. 1. Амплификацию ДНК проводили на термоциклере CFX 96 Real-Time System (BioRad). ДНК штаммов *Fusarium* нормализовали до 10 нг/мкл и использовали для построения калибровочных кривых при последовательных разведениях от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$  нг/мкл. Различия в пробах ДНК и стандартные ошибки были рассчитаны из Ct-значений, нормированных по ДНК штаммов *F. graminearum* и *F. verticillioides* с использованием программного пакета Bio-Rad CFX Manager 1.6. В каждом образце содержание ДНК грибов выражали в виде доли от содержания ДНК пшеницы (нг/нг).

**Анализ микотоксинов в зерне.** С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в зерне всех образцов определяли количества ДОН и ФВ<sub>1</sub>. Микотоксины экстрагировали из 1 г муки, добавляя 5 мл водного раствора ацетонитрила (объемное соотношение 84:16), в условиях постоянного перемешивания на шейкере S-3M (ELMI) при 300 об/мин в течение 14–16 ч. Анализ выполняли с помощью диагностических тест-систем «Дезоксинивален-нол-ИФА» и «Фумонизин В<sub>1</sub>-ИФА» (Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии). Нижний предел чувствительности метода составлял 20 мкг/кг для обоих микотоксинов.

**Статистическая обработка.** Лабораторные анализы выполнены как минимум двукратно. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 10.0 (ANOVA). Раз-

личия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## Результаты

**Высота растений и показатели продуктивности.** Высота растений сортов пшеницы существенно варьировала – от 87 до 125 см; на основании этого признака сорта распределили на четыре группы. К высокорослым (свыше 120 см) отнесен сорт Адель, к среднерослым (до 120 см) – Баграт, Бригада, Безостая 100, Васса, Курс, Лебедь, Морозко, Память, Юка. Группу короткостебельных (до 105 см) составили сорта Антонина, Велена, Гурт, Утриш, а группу полукарликов (до 90 см) – Алексеев, ГРОМ и Таня.

Масса 1000 зерен различных сортов, выращенных с применением фунгицида, варьировала от 35.8 (Велена) до 51 г (Васса), а диапазон массы зерна с колоса составлял от 1.6 (Морозко) до 2.95 г (Васса). Разброс показателей на инфекционном фоне по массе 1000 зерен был от 27.2 (Велена) до 39.6 г (Таня), а по массе зерна с колоса – от 1.10 (Бригада) до 2.23 г (Лебедь).

**Зараженность зерна грибами.** Зараженность зерна сортов пшеницы грибами *Fusarium* выявляли двумя способами – на основании микологического анализа и по числу зерен с видимыми проявлениями заболевания (только на искусственном фоне инфекции). На естественном фоне инфекции, согласно результатам микологического анализа, скрытая зараженность зерна грибами рода *Fusarium* была в среднем 6.1 % (максимальное содержание 15 % у сорта Утриш) (табл. 2).

Основным представителем фузариевых грибов был *F. graminearum* (доля вида 34.8 %), реже выявляли виды *F. sporotrichioides* Sherb., *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. semitectum* Berk. & Ravenel, *F. equiseti* (Corda) Sacc. и *F. verticillioides*.

На искусственном инфекционном фоне число зерен с явным поражением грибами *Fusarium* в образцах варьировало от 13.3 до 63.1 % (в среднем 33.8 %) (табл. 3). Микологический анализ установил варьирование скрытой зараженности зерна от 2.0 до 54.0 % (в среднем 25.8 %).

**Таблица 2.** Характеристика сортов пшеницы, выращенных на естественном фоне инфекции

Сорт	Зараженность зерна, %	Среднее кол-во ДНК грибов × 10 <sup>-5</sup> , нг/нг			ДОН, мкг/кг
		<i>F. graminearum</i>	Tri- <i>Fusarium</i> *	Fum- <i>Fusarium</i> *	
Адель	2	1	14	0	0
Алексеич	2	3	21	0	0
Антонина	6	10	41	0	62
Баграт	5	5	23	3	130
Безостая 100	6	6	19	0	43
Бригада	11	43	42	0	421
Васса	10	5	21	0	134
Велена	6	13	34	0	166
ГРОМ	8	5	19	0	189
Гурт	2	3	28	0	33
Курс	4	1	16	0	50
Лебедь	7	1	17	0	11
Морозко	6	4	15	0	54
Память	6	10	31	2	172
Таня	4	1	20	0	12
Утриш	15	15	29	0	162
Юка	3	3	34	0	24
V, %	57	129	36	294	109

\* Tri-*Fusarium* и Fum-*Fusarium* – виды грибов, способные образовывать трихотеценовые микотоксины или фумонизины соответственно; V – коэффициент вариации.

**Таблица 3.** Характеристика сортов пшеницы, выращенных на фоне инокуляции грибом *F. graminearum*

Сорт	Масса 1000 зерен, г	Масса зерна с колоса, г	Зараженность зерна грибами, %		Среднее кол-во ДНК грибов × 10 <sup>-3</sup> , нг/нг		Кол-во микотоксинов, мкг/кг	
			явная	скрытая	<i>F. graminearum</i>	Fum- <i>Fusarium</i> *	ДОН	ФВ <sub>1</sub>
Адель	38.0	1.9	13	2	7	5	23069	1471
Алексеич	39.6	2.0	31	42	15	17	35330	1800
Антонина	32.4	1.4	24	14	4	5	29557	4435
Баграт	30.8	1.3	52	12	16	9	73502	5519
Безостая 100	38.0	1.9	46	27	15	5	46574	2172
Бригада	29.2	1.4	25	33	11	8	20255	980
Васса	27.6	1.2	55	38	21	19	50655	5475
Велена	38.6	2.2	24	13	12	7	60901	3800
ГРОМ	31.6	1.1	44	44	23	5	51708	4360
Гурт	31.1	1.2	34	20	15	9	53048	6358
Курс	30.1	1.1	41	22	22	7	44124	1693
Лебедь	32.3	1.6	15	13	14	6	46572	1725
Морозко	27.2	1.5	35	13	10	3	66193	1525
Память	32.7	1.2	13	30	7	7	41174	2898
Таня	31.9	1.7	25	39	16	9	45471	4105
Утриш	38.0	1.9	63	54	50	45	55019	20326
Юка	27.7	1.3	33	23	17	9	76401	9288
V, %	12.7	22.1	43	55	62	95	33	101

\* Fum-*Fusarium* – виды грибов, способные образовывать фумонизины; V – коэффициент вариации.

В обоих случаях максимальные значения показателей выявлены у сорта Утриш, а наименьшие – у сорта Адель. Низкой зараженностью зерна характеризовались также сорта Память, Лебедь, Антонина и Велена.

В зерне всех 17 сортов пшеницы выявлена высокая зараженность не только грибом *F. graminearum*, которым инокулировали растения, но и *F. verticillioides*. Средняя зараженность этим видом гриба зерна всех сортов превышала их зараженность *F. graminearum* в 11.5 раз. Кроме *F. verticillioides*, единично идентифицирован *F. proliferatum* (зараженность зерна не более 1–2 %), поэтому в качестве основного продуцента ФВ<sub>1</sub> можно рассматривать грибок *F. verticillioides*. Другие виды грибов *Fusarium* в зерне пшеницы, выращенной на искусственном фоне инфекции, не обнаружены.

**Содержание ДНК грибов в зерне.** В зерне всех сортов пшеницы, выращенных на естественном фоне, количество ДНК *F. graminearum* выявлено в диапазоне  $(1.1–42.7) \times 10^{-5}$  нг/нг. По содержанию ДНК этого патогена сорта можно распределить на три группы. Первую группу относительно устойчивых сортов (количество гриба в зерне не превышало  $3 \times 10^{-5}$  нг/нг) составили Адель, Таня, Лебедь, Курс, Гурт и Юка. Ко второй группе среднеустойчивых сортов (количество гриба варьировало от  $3 \times 10^{-5}$  до  $6 \times 10^{-5}$  нг/нг) были отнесены Алексеич, Морозко, ГРОМ, Васса, Баграат и Безостая 100. Третью группу относительно восприимчивых сортов с наибольшим содержанием ДНК *F. graminearum* (более  $6 \times 10^{-5}$  нг/нг) составили Утриш, Антонина, Память, Велена и Бригада. Кроме *F. graminearum*, в зерне всех образцов пшеницы обнаружена ДНК Tri-*Fusarium* с диапазоном  $(13.9–42.3) \times 10^{-5}$  нг/нг, в то время как ДНК Fum-*Fusarium* выявлена в зерне только двух сортов пшеницы, Память и Баграат, со средними значениями  $1.9 \times 10^{-5}$  и  $3.3 \times 10^{-5}$  нг/нг соответственно.

На искусственном инфекционном фоне количество ДНК *F. graminearum* в зерне всех сортов было значительно выше, чем в естественных условиях, и варьировало в пределах  $(4.24–49.8) \times 10^{-3}$  нг/нг. В зерне сортов Антонина, Память, Адель и Морозко количество ДНК гриба было наименьшим, в то время как его наибольшие количества выявлены в зерне сортов Утриш, Васса, Курс и ГРОМ. Установлено, что в зерне искусственно инокулированных растений количество ДНК Fum-*Fusarium* варьировало в пределах  $(3.4–44.8) \times 10^{-3}$  нг/нг. Как и в случае с ДНК *F. graminearum*, высокое количество ДНК Fum-*Fusarium* выявлено в зерне сортов Утриш, Васса и Алексеич, а низкое количество ДНК этой группы грибов обнаружено в зерне сортов Антонина, ГРОМ, Безостая 100 и Морозко.

**Содержание микотоксинов в зерне.** В зерне сортов пшеницы, выращенных в естественных условиях, ДОН выявлен в 15 образцах, кроме сортов Адель и Алексеич. Максимум ДОН (420 мкг/кг) обнаружен в зерне сорта Бригада, также содержащего максимальное количество ДНК *F. graminearum*. Микотоксин ФВ<sub>1</sub> в зерне сортов пшеницы, выращенных на естественном фоне, не выявили.

Образцы зерна всех сортов пшеницы, выращенных на искусственном инфекционном фоне *F. graminearum*, содержали ДОН в количествах от 20255 до 79245 мкг/кг. Высокие количества этого микотоксина установлены в зерне сортов Юка и Баграат. Микотоксин ФВ<sub>1</sub> выявлен в

зерне всех 17 сортов в диапазоне от 980 до 20326 мкг/кг. Сорт Бригада характеризовался минимальным, а сорт Утриш, напротив, максимальным содержанием ФВ<sub>1</sub>. Количество ФВ<sub>1</sub>, превышающее среднее содержание этого микотоксина (4584 мкг/кг), также было выявлено в зерне сортов Баграат, Васса, Гурт и Юка.

## Обсуждение

Компоненты урожайности позволяют судить о продуктивности сортов и их реакции на условия выращивания. Следует отметить выравненность показателей продуктивности анализируемых сортов пшеницы, о чем свидетельствуют низкие коэффициенты вариации и по массе 1000 зерен (12.7 %), и по массе зерна с одного колоса (22.1 %). Эти результаты демонстрируют ориентированную направленность селекции на высокую урожайность зерна.

Коэффициент вариации содержания ДНК *F. graminearum* в зерне сортов, выращенных на естественном фоне инфекции, составил 126.3 %. В то же время содержание Tri-*Fusarium* было более выровненным – коэффициент вариации составил 36.0 %. Несмотря на то, что связь между количеством ДНК Tri-*Fusarium* и ДНК *F. graminearum* была существенной (+0.68), на основании значительного разброса значений признака сравнение генотипов пшеницы лучше проводить по содержанию ДНК высокоагрессивного вида *F. graminearum*, чем по суммарному содержанию ДНК группы всех видов грибов, способных образовывать трихотеценовые микотоксины и характеризующихся различной патогенностью (*F. cerealis* (Cooke) Sacc., *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. langsethiae* Torp et Nirenberg, *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. sporotrichioides* и др.).

У сортов пшеницы, выращенных на естественном фоне, установлена достоверная связь между зараженностью зерна, выявленной на питательной среде, и количеством ДНК *F. graminearum* (+0.59) и ДОН (+0.66), а также между двумя последними показателями (+0.90) (табл. 4).

Соотношение ДНК *F. graminearum* к общему содержанию ДНК Tri-*Fusarium* выше 10:1 выявлено у относительно устойчивых сортов Адель, Таня, Лебедь, Курс, Гурт, Юка. Устойчивость этих сортов преодолевается высокоагрессивным *F. graminearum*, однако они способны противостоять проникновению в зерно слабопатогенных видов грибов. В то же время в зерне восприимчивых сортов обнаружены значительные количества не только ДНК *F. graminearum*, но и слабопатогенных видов грибов.

На естественном фоне относительно устойчивыми по сумме показателей, характеризующих инфицированность зерна (III тип устойчивости), были сорта Адель, Лебедь, Таня, Юка, Гурт и Курс, а восприимчивыми – Утриш и Баграат. Количество ДОН в зерне сортов было недостаточным для их ранжирования по V типу устойчивости. Однако высокая связь между ДНК *F. graminearum* и ДОН (+0.90), а также несколько меньшая между ДНК Tri-*Fusarium* и ДОН (+0.55) подтверждают основную роль *F. graminearum* в загрязнении зерна этим микотоксином в условиях естественного фона.

На фоне инокуляции растений *F. graminearum* между показателями процентного содержания числа фузариозных зерен, определенного по внешним признакам и в результате микологического анализа, установлена положитель-

**Таблица 4.** Взаимосвязь показателей, характеризующих сорта пшеницы на естественном фоне инфекции грибов *Fusarium*

Показатели	Зараженность зерна грибами <i>Fusarium</i>	ДНК грибов		
		<i>F. graminearum</i>	Tri- <i>Fusarium</i>	Fum- <i>Fusarium</i>
ДНК <i>F. graminearum</i>	+0.59*			
ДНК Tri- <i>Fusarium</i>	+0.27	+0.68*		
ДНК Fum- <i>Fusarium</i>	-0.07	-0.02	+0.02	
ДОН	+0.66*	+0.90*	+0.55*	+0.16

\*Коэффициенты корреляции существенны при уровне значимости  $p < 0.05$ .

**Таблица 5.** Взаимосвязь показателей, характеризующих сорта пшеницы на фоне инокуляции грибом *F. graminearum*

Показатели	Высота растений	Масса 1000 зерен	Масса зерна с колоса	Зараженность зерна грибами <i>Fusarium</i>		Зараженность зерна видами <i>Fusarium</i>		ДНК грибов		ДОН
				явная	скрытая	<i>F. graminearum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. graminearum</i>	Fum- <i>Fusarium</i>	
Масса 1000 зерен	+0.20									
Масса зерна с колоса	+0.18	+0.82*								
Зараженность зерна грибами <i>Fusarium</i>										
явная	-0.28	-0.54*	-0.64*							
скрытая	-0.58*	-0.08	-0.39	+0.50*						
Зараженность зерна <i>F. graminearum</i>	-0.30	-0.10	-0.30	+0.12	+0.27					
Зараженность зерна <i>F. verticillioides</i>	-0.51*	-0.19	-0.27	+0.54*	+0.63*	+0.23				
ДНК <i>F. graminearum</i>	-0.26	-0.23	-0.41	+0.75*	+0.66*	+0.09	+0.56*			
ДНК Fum- <i>Fusarium</i> *	-0.25	-0.13	-0.30	+0.60*	+0.65*	-0.25	+0.52*	+0.87*		
ДОН	-0.32	-0.41	-0.15	+0.47	-0.05	+0.08	+0.48	+0.30	+0.11	
ФВ <sub>1</sub>	-0.31	-0.14	-0.23	+0.59*	+0.48	-0.08	+0.63*	+0.83*	+0.85*	+0.39

\*Коэффициенты корреляции существенны при уровне значимости  $p < 0.05$ .

ная связь (+0.50) (табл. 5). Достоверная связь выявлена также между показателями зараженности зерна и содержанием ДНК *F. graminearum* и Fum-*Fusarium*. Однако только число зерен с явными симптомами заболевания достоверно и негативно связано с показателями продуктивности – массой зерна с колоса и массой 1000 зерен.

Отмечена выравненность значений содержания ДНК *F. graminearum* и его метаболита ДОН – коэффициенты вариации составили 62.2 и 32.8 % соответственно. Инфицированность *F. verticillioides* и загрязнение ФВ<sub>1</sub> зерна пшеницы реализовались в значительно большем разбросе значений – коэффициенты вариации 95.4 и 100.6 % соответственно. Выявлена достоверная положительная связь процентного содержания фузариозных зерен (явная и скрытая зараженность) только с зараженностью *F. verticillioides*, которая в равной степени была связана как с содержанием ДНК Fum-*Fusarium*, так и с ДНК *F. graminearum*.

На искусственном инфекционном фоне сорта Адель, Память, Морозко и Антонина охарактеризованы как относительно устойчивые, а сорта Утриш, Васса, ГРОМ и Алексеич – восприимчивые к заражению зерна грибами *Fusarium*. Самые низкие количества ДОН и ФВ<sub>1</sub> выявля-

ны в зерне сортов Адель, Бригада и Антонина. Значительные количества ДОН в зерне накапливал сорт Алексеич, а ФВ<sub>1</sub> – сорта Таня и Алексеич.

Наши результаты показывают, что оценка сортов в различных условиях может приводить к несогласованности их характеристик по разным параметрам устойчивости. Сорт Бригада, на естественном фоне инфекции высоковосприимчивый к заражению зерна и накоплению ДОН, был относительно устойчив по этим показателям при выращивании на искусственном инфекционном фоне. Сорт Алексеич, несмотря на относительно высокое процентное содержание фузариозных зерен, можно охарактеризовать как относительно устойчивый и по содержанию ДНК грибов, и по количеству микотоксинов. У сорта Васса не установлено присутствие *F. graminearum* в зерне при микологическом анализе, но содержание ДНК *F. graminearum* и ДОН было на уровне средних значений по всем сортам, а количество ДНК Fum-*Fusarium* и ФВ<sub>1</sub> было высоким. Эти различия могут быть связаны с взаимодействием грибов и/или условиями окружающей среды.

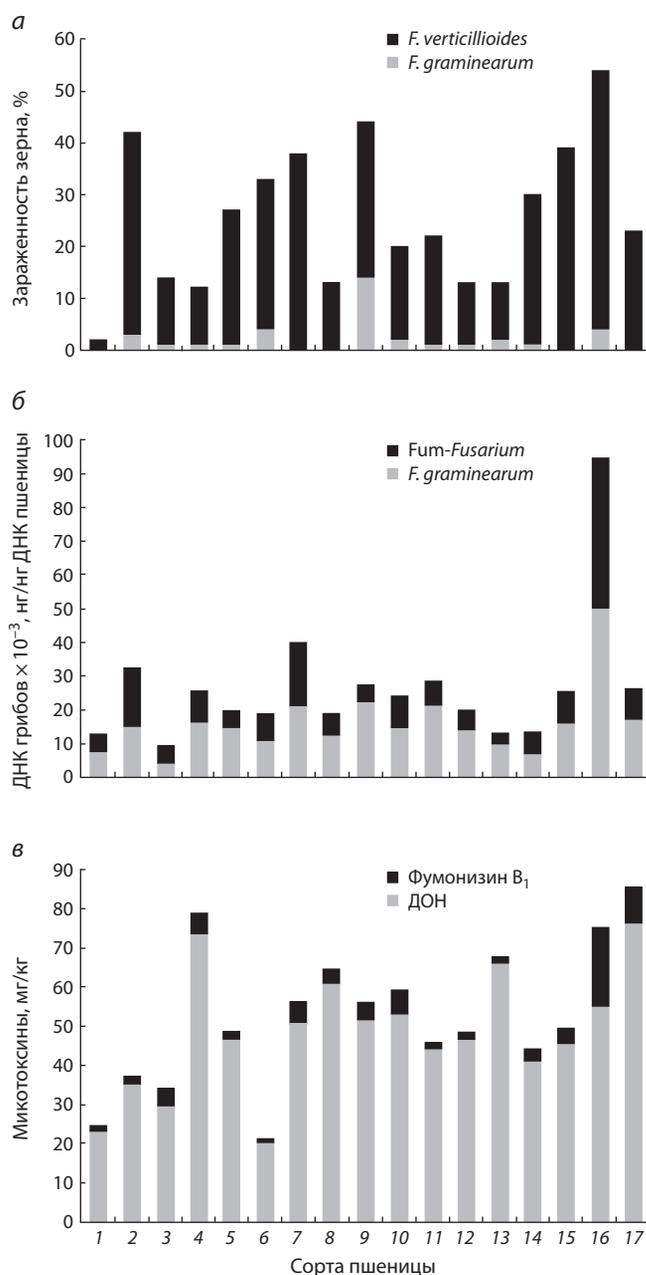
Значительная зараженность грибом *F. verticillioides* зерна сортов, инокулированных в период цветения грибом *F. graminearum*, была неожиданной. По всей видимости,

источником инфекции послужили растительные остатки кукурузы на поле, расположенном рядом с инфекционным питомником пшеницы. Известно, что грибок *F. verticillioides* является одним из основных возбудителей фузариоза кукурузы и долгое время сохраняется на послеуборочных остатках этой культуры (Dill-Macky, Jones, 2000; Maiorano et al., 2008). Корреляционный анализ показал достоверную отрицательную связь высоты растений с зараженностью зерна *F. verticillioides* ( $-0.51$ ), что подтверждает роль растительных остатков как источников инфекции. При этом не выявлена связь высоты с зараженностью зерна *F. graminearum*, которая в основном является результатом опрыскивания суспензией гриба.

Средняя зараженность зерна *F. verticillioides* была более чем в 10 раз выше зараженности *F. graminearum* (рисунок) и была связана с числом явно фузариозных зерен ( $+0.54$ ) и со скрытой зараженностью зерна грибами *Fusarium* ( $+0.63$ ). В то же время в случае заражения зерна *F. graminearum* такие зависимости не установлены. Зараженность *F. verticillioides* была достоверно связана также с количеством ФВ<sub>1</sub> ( $+0.63$ ) и ДНК анализируемых грибов ( $+0.52$  и  $+0.56$ ). В среднем по сортам содержание ДНК *F. graminearum* было сопоставимо с содержанием ДНК *Fum-Fusarium*, но количество ДОН значительно превышало количество ФВ<sub>1</sub>.

Полученные нами результаты демонстрируют, что при высокой встречаемости *F. verticillioides* процентное содержание зерен, зараженных *F. graminearum*, не было связано с количеством биомассы этого патогена и образуемого им ДОН. В этом случае содержание ДНК *F. graminearum* положительно и достоверно было связано с содержанием ДНК *Fum-Fusarium* ( $+0.83$ ), а также с ФВ<sub>1</sub> ( $+0.87$ ). По всей видимости, *F. graminearum*, проникая в растения, также создавал благоприятные условия для их колонизации слабопатогенным *F. verticillioides* и образования ФВ<sub>1</sub>. Известно, что ДОН является фактором агрессивности *F. graminearum*, способствующим заселению субстрата грибом (Alexander et al., 2009; Audenaert et al., 2013). Фумонины, напротив, не играют существенной роли при инфицировании растений *F. verticillioides* – не выявлено зависимости между способностью изолятов гриба продуцировать ФУМ и их агрессивностью (Desjardins, Plattner, 2000; Desjardins et al., 2002; Presello et al., 2006; Iglesias et al., 2010). Французские исследователи продемонстрировали конкурентные преимущества *F. verticillioides* по сравнению с *F. graminearum* при совместной инокуляции кукурузы этими грибами, но предварительное инфицирование *F. graminearum* початков кукурузы способствовало последующему развитию в них *F. verticillioides* (Picot et al., 2012).

При совместной встречаемости грибов в образце зерна (и даже в одной зерновке) между ними неизбежно возникают взаимодействия, влияющие на образование вторичных метаболитов. Как правило, ФУМ обнаруживают в основном в зерне кукурузы, но наблюдаемое в последнее время увеличение площадей под этой культурой неизбежно приведет к повышению значимости ФУМ, в том числе и в зерне злаковых культур. Несмотря на информацию об увеличении частоты встречаемости *F. verticillioides* и *F. proliferatum* и их микотоксинов в зерне пшеницы и ячменя, еще недостаточно известно о взаимоотношении



Соотношение показателей, характеризующих устойчивость сортов озимой пшеницы, выращенных на искусственном инфекционном фоне: (а) процентное содержание зерен, зараженных *F. graminearum* и *F. verticillioides*; (б) содержание ДНК этих грибов и (в) продуцируемых ими микотоксинов.

Сорта: 1 – Адель; 2 – Алексеич; 3 – Антонина; 4 – Баграг; 5 – Безостая 100; 6 – Бригада; 7 – Васса; 8 – Велена; 9 – ГРОМ; 10 – Гурт; 11 – Курс; 12 – Лебедь; 13 – Морозко; 14 – Память; 15 – Тая; 16 – Утриш; 17 – Юка.

этих видов грибов и растений (Stanković et al., 2011). Совместное присутствие трихотеценовых микотоксинов и ФУМ в зерне значительно ухудшает его пищевые и кормовые качества. Необходимо активизировать работу по выведению высокоустойчивых к заражению грибами *Fusarium* сортов, не накапливающих микотоксины. Выделение устойчивых сортов остается одним из самых эффективных приемов защиты растений, ведущим к получению высокого качественного урожая.

## Заклучение

Установлено, что сорт озимой пшеницы Адель является высокоустойчивым как к заражению *F. graminearum* и *F. verticillioides*, так и к накоплению микотоксинов, образующихся этими грибами. По сумме анализированных показателей устойчивости к фузариозу зерна сорта Антонина, Лебедь и Память охарактеризованы как относительно устойчивые, а Утриш – как высоковосприимчивый.

Показано сходство реакций устойчивости сортов пшеницы к заражению *F. graminearum* и *F. verticillioides* и существование взаимодействия между этими грибами в процессе колонизации зерна. Необходимо усилить селекцию высокоустойчивых к фузариозу сортов пшеницы и их повсеместное возделывание.

## Благодарности

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 14-26-00067).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

- Аблова И.Б., Беспалова Л.А., Колесников Ф.А., Набоков Г.Д., Пузырная О.Ю., Филобок В.А. Селекция пшеницы на устойчивость к болезням. Земледелие. 2014;3:19-22. [Ablova I.B., Bespalova L.A., Kolesnikov F.A., Nabokov G.D., Puzyrnaya O.Yu., Filobok V.A. Wheat breeding for disease resistance. Zemledelie = Agriculture. 2014;3:19-22. (in Russian)]
- Аблова И.Б., Тараненко С.А. Методические аспекты создания искусственного инфекционного фона по фузариозу колоса озимой пшеницы. Эволюция научных технологий в растениеводстве. 2004;1:382-390. [Ablova I.B., Taranenko S.A. Methodological aspects of the creation of artificial infection background for *Fusarium* head blight of winter wheat. Evolution of Scientific Technologies in Plant Science. 2004;1:382-390. (in Russian)]
- Бабаянц Л.Т., Мештерхази А., Вехтер В. Методика селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. Прага, 1988. [Babayants L.T., Meshterkhazi A., Vekhter V. Methods of Breeding and Assessment of Disease Resistance of Wheat and Barley in CMEA Countries. Prague, 1988. (in Russian)]
- Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б., Филобок В.А., Худокормова Ж.Н., Давоян Р.О., Давоян Э.Р., Карлов Г.И., Соловьев А.А., Дивашук М.Г., Майер Н.К., Дудников М.В., Мироненко Н.В., Баранова О.А. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Вавилковский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):37-43. [Bespalova L.A., Vasilyev A.V., Ablova I.B., Filobok V.A., Khudokormova Z.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. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2012;2(4):286-290.]
- Беспалова Л.А., Романенко А.А., Колесников Ф.А., ..., Калмыш А.П., Пономарев Д.А., Белякова А.Ю. Сорта пшеницы и тритикале Краснодарского НИИСХ имени П.П. Лукьяненко. Краснодар: ЭДВИ, 2017. [Bespalova L.A., Romanenko A.A., Kolesnikov F.A., ..., Kalmysh A.P., Ponomarev D.A., Belyakova A.Yu. Varieties of Wheat and Triticale from the Lukyanenko Agricultural Research Institute. Krasnodar, 2017. (in Russian)]

- Гаггаева Т.Ю., Гаврилова О.П. Зараженность зерна грибами *Fusarium* в Краснодарском и Ставропольском краях. Защита и карантин растений. 2014;3:30-33. [Gagkaeva T.Yu., Gavriloва O.P. Grain infection by *Fusarium* fungi in the Krasnodar and Stavropol regions. Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine. 2014;3:30-33. (in Russian)]
- Alexander N.J., Proctor R.H., McCormick S.P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. Toxin Rev. 2009;28(2-3):198-215. DOI 10.1080/15569540903092142.
- Audenaert K., Vanheule A., Höfte M., Haesaert G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. Toxins. 2013;6:1-19. DOI 10.3390/toxins6010001.
- Desjardins A.E., Munkvold G.P., Plattner R.D., Proctor R.H. *FUM1* – a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. Mol. Plant-Microbe Interact. 2002;11:1157-1164. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.11.1157.
- Desjardins A.E., Plattner R.D. Fumonisin B (1)-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. J. Agric. Food Chem. 2000;48:5773-5780.
- Dill-Macky R., Jones R.K. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. Plant Dis. 2000;84:71-76. DOI 10.1094/PDIS.2000.84.1.71.
- Gerlach W., Nirenberg H. The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas Mitt. Biol. Bund. Ld. Berlin, 1982.
- Halstensen A.S., Nordby K.C., Eduard W., Klemsdal S.S. Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. J. Environ. Monit. 2006;8:1235-1241. DOI 10.1039/b609840a.
- Iglesias J., Presello D.A., Botta G., Lori G.A., Fauguel C.M. Aggressiveness of *Fusarium* section *Liseola* isolates causing maize ear rot in Argentina. Eur. J. Plant Pathol. 2010;92(1):205-211. DOI 10.4454/jpp.v92i1.31.
- Maiorano A., Blandino M., Reyneri A., Vanara F. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. Crop Prot. 2008;27:182-188. DOI 10.1016/j.cropro.2007.05.004.
- Mesterhazy A. Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight in wheat. J. Appl. Genet. 2002;43A:289-302.
- Nicolaisen M., Suprunie S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A.F. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. J. Microbiol. Methods. 2009;76:234-240. DOI 10.1016/j.mimet.2008.10.016.
- Picot A., Hourcade-Marcolla D., Barreau C., Pinson-Gadais L., Caron D., Richard-Forget F., Lannou C. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. Plant Pathol. 2012;61:140-151. DOI 10.1111/j.1365-3059.2011.02503.x.
- Preiser V., Goetsch D., Sulyok M., Krska R., Mach R.L., Farnleitner A., Brunner K. The development of a multiplex real-time PCR to quantify *Fusarium* DNA of trichothecene and fumonisin producing strains in maize. Anal. Methods. 2015;7:1358-1365.
- Presello D.A., Iglesias J., Botta G., Lori G.A., Eyherabide G.H. Stability of maize resistance to the ear rots caused by *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* in Argentinean and Canadian environments. Euphytica. 2006;147:403-407. DOI 10.1007/s10681-005-9037-8.
- Stanković S., Lević J., Krnjaja V. Fumonisin B<sub>1</sub> in maize, wheat and barley grain in Serbia. Biotechnol. Animal Husb. 2011;27(3):631-641. DOI 10.2298/BAH1103631S.
- Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Jestoi M., Parikka P., Hietaniemi V., Gagkaeva T., Sarlin T., Haikara A., Laaksonen S., Rizzo A. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 2008;41:243-260. DOI 10.1080/03235400600680659.

## ORCID ID

T.Yu. Gagkaeva orcid.org/0000-0002-3276-561X  
A.S. Orina orcid.org/0000-0002-7657-6618

O.P. Gavriloва orcid.org/0000-0002-5350-3221  
I.B. Ablova orcid.org/0000-0002-3454-9988  
L.A. Bespalova orcid.org/0000-0003-3844-9682

# Finding *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*-like sequences in conventionally bred potato varieties

O.Y. Antonova<sup>1</sup>, N.S. Klimenko<sup>1</sup>, Z.Z. Evdokimova<sup>2</sup>, L.I. Kostina<sup>1</sup>, T.A. Gavrilenko<sup>1, 3</sup> 

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

<sup>2</sup> Leningrad Scientific Research Institute "Belogorka", Leningrad region, Gatchinsky district, Russia

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, Biological faculty, St. Petersburg, Russia

The main objectives in potato breeding are increasing yield abilities and improving resistance to numerous pathogens and pests. Among them, the late blight caused by the *Phytophthora infestans* oomycete is one of the most destructive potato diseases both in Russia and worldwide. Wild relatives of cultivated potato are traditionally used in breeding as the source of valuable *R* genes conferring resistance to pathogens. Of particular interest are Mexican wild species because Mexico is the centre of origin and diversity of *P. infestans* and at the same time, it is the centre of potato species diversity. Mexican wild potato species *S. bulbocastanum* and *S. stoloniferum* are an important source of the *R* genes conferring broad-spectrum resistance against various isolates of *P. infestans* (*Rpi-blb1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-sto1*). Recently these genes have been transferred into cultivated potato gene pool using the cisgene approach. At the same time there is a high probability of finding genotypes with the *Rpi-sto1* gene (functional homologues of *Rpi-blb1*) among conventionally bred varieties because for about 40 years *S. stoloniferum* has been used in breeding as a source of the *Ry<sub>sto</sub>* and *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>* genes of the extreme resistance to the most important viral pathogen PVY. In this study 188 potato varieties bred in Russia and in near-abroad countries were screened for the presence of six gene-specific markers of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* and *Rpi-blb2* genes conferring broad-spectrum resistance against *P. infestans*, and for the markers linked to the *Ry<sub>sto</sub>* and *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>* genes conferring extreme resistance to PVY. In addition, a marker for detecting male sterile mitochondrial DNA type gamma derived from *S. stoloniferum* was used. The genotypes selected through the molecular markers were divided into four groups: (A) 13 PVY resistant varieties carrying diagnostic markers of the *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>* genes and having sterile mt-type gamma; (B) four varieties possessing mt-type gamma and not having the markers of the *R* genes introgressed from *S. stoloniferum*; (C) eight genotypes carrying five gene-specific markers for the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*; (D) the rest 166 (86.9 %) varieties not possessing any of the diagnostic markers associated with the *S. stoloniferum* genetic material. The sequences of the *Rpi-sto1* and BLB1 F/R-amplicons were identical in all the genotypes of group 'C' and showed respective 99 % and 100 % similarity to the corresponding fragments of the *Rpi-sto1* and *Rpi-blb1* genes from the GenBank database. Among the genotypes of group 'C' various mt-types were detected, and some of them were male fertile.

Key words: potato; *Solanum stoloniferum*; marker assisted selection; *R* genes; *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*; male sterility.

## Последовательности, гомологичные участкам гена *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, у сортов картофеля, созданных методами традиционной селекции

О.Ю. Антонова<sup>1</sup>, Н.С. Клименко<sup>1</sup>, З.З. Евдокимова<sup>2</sup>, Л.И. Костина<sup>1</sup>, Т.А. Гавриленко<sup>1, 3</sup> 

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

<sup>2</sup> Ленинградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Белогорка», Ленинградская область, Гатчинский район, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

Традиционные задачи селекции картофеля – повышение урожайности и устойчивости к многочисленным патогенам и вредителям. Из них наибольший ущерб картофелеводству как в России, так и мире наносит фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans*. Дикие виды картофеля используются в селекции в качестве источников *R* генов устойчивости к патогенам. Особый интерес представляют мексиканские виды, поскольку Мексика – центр происхождения и разнообразия *P. infestans* и центр разнообразия видов картофеля. Дикие мексиканские виды картофеля *S. bulbocastanum* и *S. stoloniferum* являются источниками *R* генов устойчивости к широкому спектру рас *P. infestans* (*Rpi-blb1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-sto1*). В последние годы эти гены были интрогрессированы в геном культурного картофеля с использованием методов цис-генетики. В то же время высока вероятность выявления генотипов с геном *Rpi-sto1* (функциональный гомолог *Rpi-blb1*) у сортов, созданных методами традиционной селекции, поскольку уже около 40 лет селекционеры используют *S. stoloniferum* в качестве источника устойчивости к наиболее вредоносному вирусу картофеля – PVY. В настоящей работе проведен молекулярный скрининг 188 сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья с ген-специфичными маркерами *RB/Rpi-blb1*, *Rpi-sto1* и *Rpi-blb2*; маркерами, сцепленными с генами *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>*, детерминирующими устойчивость к PVY, и маркером митотипа гамма, ассоциированного с мужской стерильностью *S. stoloniferum* гибридов. Отобранные в молекулярном скрининге генотипы могут быть разделены на четыре группы: (A) 13 устойчивых к PVY сортов с диагностическими маркерами генов *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub>* и со стерильным мт-типом гамма; (B) четыре сорта с мт-типом гамма, не обладающие маркерами *R* генов устойчивости, интрогрессированных от *S. stoloniferum*; (C) восемь генотипов, у которых были детектированы все пять ген-специфичных маркеров гена *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*; (D) оставшиеся 166 (86.9 %) сортов выборки, у которых не были выявлены маркеры *R* генов устойчивости *S. stoloniferum* и митотип

гамма. Последовательности ПЦР продуктов, полученные при амплификации с ген-специфичными праймерами Rpi-sto1 и BLBF/R, у всех генотипов группы С были идентичны и имели 99 и 100 % сходства с соответствующими фрагментами референсных последовательностей генов Rpi-sto1 и Rpi-blb1 из GenBank. В группе С выявлены генотипы с различными мт-типами, среди них – образцы с мужской фертильностью.

Ключевые слова: картофель; *Solanum stoloniferum*; маркер-вспомогательный отбор; R гены; RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1; мужская стерильность.

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Antonova O.Y., Klimenko N.S., Evdokimova Z.Z., Kostina L.I., Gavrilenko T.A. Finding RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1-like sequences in conventionally bred potato varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):693-702. DOI 10.18699/VJ18.412

The common potato (*Solanum tuberosum* L.) is the first non-grain food crop in the world and in Russia. Potato varieties are susceptible to many diseases and pests so the main objectives in potato breeding are increasing yield abilities and resistance to numerous fungal, viral, bacterial pathogens and pests. Among them, late blight caused by the *Phytophthora infestans* oomycete remains the most destructive disease that decrease potato production both worldwide (Haverkort et al., 2008, 2009, 2016) and in Russia (Elanskij, 2015). To control late blight and prevent yield losses, potato cultivation requires frequent fungicide treatments, e. g. in Northern Europe such treatments are performed from 10 to 15 times a year and up to 25 times – in humid summers (Fact Series..., 2014). Growing of potato varieties with durable resistance against late blight is one of the main strategies of reducing the use of chemical fungicides.

Breeding potatoes resistant to *P. infestans* has been continuing for about 100 years. Various wild potato species have been found to be resistant to late blight and some of them have been actively used in breeding (Hanneman, Bamberg, 1986; Zoteyeva et al., 2012). Among them Mexican potatoes are of particular interest because the central regions of Mexico are considered to be a center of genetic diversity both for *P. infestans* and for wild potato species (Hawkes, 1990; Fry et al., 1993; Goss et al., 2014). *Solanum demissum*, indigenous to Mexico, served as an initial source of late blight resistance genes (named R1 to R11) in potato breeding. These R genes conferring race-specific resistance against *P. infestans* were introgressed from *S. demissum* into the gene pool of *S. tuberosum* through interspecific crosses and conventional breeding in the first part of the last century (Malcolmson, Black, 1966). However, this race-specific resistance was quickly overcome by specific *P. infestans* strains (Wastie, 1991; Fry, Goodwin, 1997; Fry, 2008). In the subsequent decades, the efforts of breeders were aimed at a search for new sources of race-non-specific durable resistance against *P. infestans* that were found in many wild potato species (Ross, 1986). However, breeding of new varieties with race-non-specific resistance is time-consuming and laborious because of polygenic inheritance, as QTLs for this type of resistance were mapped on all the twelve potato chromosomes (Simko, 2002).

The R genes conferring broad-spectrum resistance against various *P. infestans* isolates have been found in several Mexican species that are highly resistant to late blight but less easy crossable with cultivated potato in comparison with *S. demissum*, e. g. broad spectrum resistance genes were identified in

Mexican diploid species *S. bulbocastanum* – the RB gene also known as Rpi-blb1 (Naess et al., 2000; Song et al., 2003; van der Vossen et al., 2003) and the Rpi-blb2 (van der Vossen et al., 2005), both encode CC-NB-LRR proteins (Vleeshouwers et al., 2011). The interspecific incompatibility between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* was overcome using ploidy manipulations, interspecific bridge crosses with the other wild species and subsequent backcrossing of the complex hybrids (Hermsen, Ramanna, 1973). As a result of long-term conventional breeding process that lasted for 46 years, the Rpi-blb2 gene from *S. bulbocastanum* has been introgressed into a common potato gene pool and two late blight resistant varieties carrying this gene – Bionica and Toluca – have been developed (Haverkort et al., 2009). The RB/Rpi-blb1 gene was introgressed into the *S. tuberosum* genome through somatic hybridization (Helgeson et al., 1998).

The functional homologues of the *S. bulbocastanum* RB/Rpi-blb1 gene were detected in Mexican allotetraploid species *S. stoloniferum* (= *S. papita*, *S. polytrichon*): Rpi-sto1, Rpi-plt1, Rpi-pta1, Rpi-pta2 (Vleeshouwers et al., 2008; Wang et al., 2008; Lokossou et al., 2010). M. Wang with colleagues (2008) suggested that *S. bulbocastanum* is one of the progenitors of *S. stoloniferum*.

The RB/Rpi-blb1 and Rpi-blb2 from *S. bulbocastanum* and Rpi-sto1 from *S. stoloniferum* were mapped and cloned (Song et al., 2003; van der Vossen et al., 2003, 2005; Vleeshouwers et al., 2008). After that a transgenic approach using genes from crossable species (cisgenesis) was developed to improve late blight resistance in cultivated potato (Haverkort et al., 2009, 2016). Genetically modified (GM) cisgenic potato clones carrying a single Rpi-gene demonstrated only partial resistance to the aggressive isolates of *P. infestans*, whereas cisgenic GM clones containing Rpi gene combinations had a high level of broad-spectrum resistance (Haverkort et al., 2016). However, cultivation of such resistant genotypes (e. g. of cisgenic *Phytophthora*-resistant variety ‘Fortuna’ having the Rpi-blb1 and Rpi-blb2 genes) has still been a questionable issue because cisgenic plants remain under GMO regulation in the EU (Haverkort et al., 2016; van Hove, Gillund, 2017). At the same time, conventionally bred varieties Bionica and Toluca with the introgressed Rpi-blb2 gene can be cultivated in the EU without any limitations.

It is interesting to note that *S. stoloniferum*, a wild Mexican species with functional homologues of the RB/Rpi-blb1 gene, can be directly crossed with cultivated potato (Jackson, Hanneman, 1999), but this wild species has not been actively

involved in a breeding program the directed on broad-spectrum late blight resistance. The efforts of breeders were usually focused on *S. stoloniferum* as a source of extreme resistance to potato virus Y (PVY) to be the most important viral pathogen of cultivated potato (Ross, 1986). Many West-European varieties have been developed based on interspecific hybrids *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*. They inherit the *Ry<sub>sto</sub>* and/or *Ry-f<sub>sto</sub>* genes from *S. stoloniferum*, both conferring extreme resistance to PVY (Flis et al., 2005; Song, Schwarzfischer, 2008). According to literature, the gene *Ry<sub>sto</sub>* has always been associated with mitochondrial type (mt-type) gamma and with maternally inherited male sterility (Song, Schwarzfischer, 2008).

In the Russian Federation are mainly two centers bred potato varieties from interspecific hybrids with *S. stoloniferum*. These are (1) A.G. Lorkh All-Russian Potato Research Institute (VNIISKH) located in Moscow region, whose efforts are focused on developing PVY resistant material and (2) Leningrad Scientific Research Institute “Belogorka” (LenNIISKh ‘Belogorka’) located in north-west region of Russia whose efforts are concentrated on developing of late blight resistant material. Recently, we screened the 39 cultivars and breeding clones developed in the LenNIISKh ‘Belogorka’ and selected five genotypes carrying gene-specific markers for *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*; three of these genotypes were bred up to the variety level (Gavrilenko et al., 2018).

The objectives of the present study were to screen a wider subset of 188 potato varieties with the markers of the *R* genes originating from *S. stoloniferum* and to provide evidences of the presence of *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*-like sequences in the selected varieties and breeding clones.

## Material

The one hundred eighty five varieties chosen for this study were obtained from the national potato germplasm collection maintained at VIR. Special attention was paid to the varieties having *S. stoloniferum* hybrids in their pedigrees. The pedigree records were received from different sources (Simakov et al., 2007; Yashina et al., 2010; Russian Varieties..., 2011; Kostina, et al., 2016; Potatoes..., 2016). According to the published data *S. stoloniferum* was involved in the pedigrees of 28 varieties (their names are underlined – see below); most of them show extreme or high resistance to PVY. It was also possible that *S. stoloniferum* had participated in the origin of more than these 28 varieties because many cultivars had unknown ancestors or their pedigree records indicated interspecific hybrids of unknown origin. The following cultivars were subjected to molecular screening: Aksamit, Al’pinist, Alena, Alisa, Ametist, Amur, Antoshka, Arhideja, Arlekin, Avrora, Babushka, Barin, Baron, Belosnezhka, Beluha, Bezhickii, Bol’shevik, Bolvinskij, Borodjanskij rozovyj, Brat-2, Bravo, Brjanskaja novinka, Brjanskij delikates, Brjanskij krasnyj, Brjanskij nadezhnyj, Brjanskij rannij, Bronnickij, Buket, Chaja, Chajka, Divo, Doncovskij, Druznyj, Falenskij, Fermer, Filatovskij, Fioletovij, Fokinskij, Garant, Gart, Golubizna, Gorizont, Gorjanka, Gornoural’skij, Granat, Gubernator, Hibinskij rannij, Il’inskij, Imandra, Impala, Irbitskij, Iskra, Javar, Jeffekt, Jenergija, Jubilej Zhukova, Jubilejnyj Osetii, Jupiter, Kabardinskij, Kalinka, Kamenskij, Kameraz, Katjusha, Kemerovchanin, Kemerovskij, Kolobok, Kolpashevskij, Komsomolec 20, Korenevskij, Kormilec, Korona, Kortni, Krasavica, Krasnaja gorka,

Krasnaja roza, Krasnaja zarja, Krasnoufimskij, Krepys, Kristall, Kustarevskij, Kuznechanka, Ladozhskij, Lajmdota, Lakomka, Lasunak, Lazar’, Lazurit, Lekar’, Lider, Ljubava, Ljuks, Lorh, Loshickij, Lugovskoj, Lybid’, Manifest, Mats, Matushka, Maugli, Meteor, Moskvoreckij, Murmanskij, Musingkij, Nadezhda, Nakra, Nal’chikskij, Naroch’, Nart-1, Narymka, Nauka, Nesterovskij, Nezabudka, Nikulinskij, Odissej, Ognivo, Oktjabrenok, Olimp, Parus, Pobeda, Pogarskij, Prestizh, Pribrezhnyj, Priekul’skij rannij, Prigozhij 2, Pri12 (Primorskij), Priobskij, Prizer, Prolosok, Ramzaj, Rapsodija, Rassvet, Resurs, Rezerv, Rjabinushka, Romashka, Rosinka, Rossijanka, Rumjanka, Rusalka, Rusich, Sambo, Saprykinskij, Sarovskij, Sentjabr’, Severjanin, Shaman, Shurminskij 2, Sineva, Sintez, Skarb, Skoroplodnyi, Smena, Sokol’skij, Solnyshko, Start, Svenskij, Svetljachok, Tango, Temp, Teshha, Tomich, Udacha, Ukrainskij rozovyj, Uspeh, Utenok, Varmas, Varsna, Vektar belorusskij, Veselovskij 2-4, Veteran, Virazh, Viza, Vjatka, Volzhskij, Vympel, Zagadka, Zarevo, Zaural’skij, Zdabytak, Zhavoronok, Zhigulevskij, Zhivica, Zhukovskij rannij, Zol’skij, Zvezdochka.

One hundred eighty five varieties of the studied subset had been developed and released by different Russian public institutions, and breeding stations of various geographical locations and in neighboring countries. This subset did not include the 33 varieties bred in LenNIISKh ‘Belogorka’, since the results of their molecular screening had already been published (Gavrilenko et al., 2018).

The analyzed subset also included five additional genotypes selected earlier for having three gene-specific markers – *Rpi-sto1*, *1/1’*, *BLB1F/R* (varieties Sudarynja, Evraziya, Baltijskij and breeding clones 1604/16, 1101/10) (Gavrilenko et al., 2018). In the present study these five additional genotypes were involved into sequence analysis and were screened for gene-specific markers covering the other regions of the target gene *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*. These three varieties and two breeding clones originated from the *S. stoloniferum* hybrids, and they all were bred in LenNIISKh ‘Belogorka’ (Gavrilenko et al., 2018). New perspective breeding clone 3602/28 of the same origin was also involved in molecular screening. In total experimental subset included 191 genotypes (188 varieties and three breeding clones).

The highly late blight resistant genotype of wild species *S. stoloniferum* (seedling from accession PI 205522) with the diagnostic markers of the *Rpi-sto1*, *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry-f<sub>sto</sub>* genes (Levy et al., 2017) and variety Toluca with the *Rpi-blb2* gene were used as positive controls.

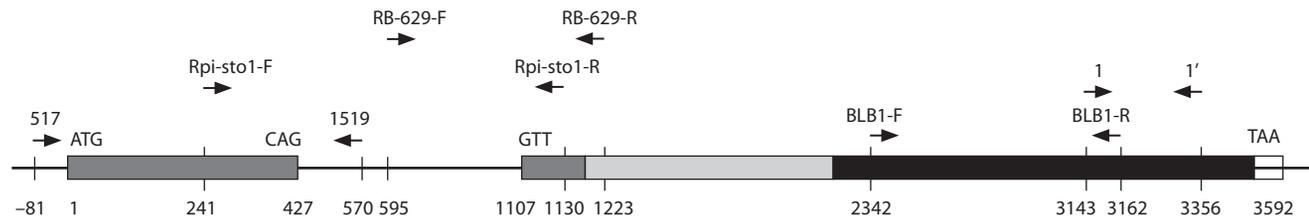
## Methods

**DNA isolation and marker assisted selection (MAS).** Genomic DNA was isolated from young leaves of the field grown plants following the modified CTAB method (Gavrilenko et al., 2013). Six gene-specific primers for the *Rpi-sto1*, *RB*, *Rpi-blb1*, and *Rpi-blb2* genes developed by different authors (Table 1) were used in this study. This set included one primer pair *1/1’* specific for the *Rpi-blb1* functional allele (Colton et al., 2006). The location of *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* gene-specific primers is indicated in the schematic diagram (Fig. 1).

We also used STS marker YES3-3A and CAPS marker GP122-406 linked with genes *Ry<sub>sto</sub>* and *Ry-f<sub>sto</sub>*, respectively. The markers had been earlier validated for MAS of West-

**Table 1.** Markers of *R* genes and mt-types used in this study

No.	Target resistance gene (chromosome)	Name of the DNA marker	Primer sequences (forward and reverse primer)	T <sub>m</sub> , °C	PCR product size, bp	References
Gene-specific markers for the <i>Rpi-sto1</i> , <i>RB</i> , <i>Rpi-blb1</i> , <i>Rpi-blb2</i>						
1	<i>Rpi-sto1</i> (VIII)	Rpi-sto1	F: ACCAAGGCCACAAGATTCTC R: CCTGCGGTTCCGGTTAATACA	65	890	Zhu et al., 2012
2	<i>RB</i> (VIII)	1/1'	F: CACGAGTGCCTTTTCTGAC R: ACAATTGAATTTTAGACTT	50	213	Colton et al., 2006
3	<i>Rpi-blb1</i> (VIII)	BLB1 F/R	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	58	821	Wang et al., 2008
4	<i>Rpi-blb1</i> (VIII)	517/1519	F: CATTCCAAGTCCATCTTGG R: TATTGATCGAAAGTACAACG	58	651	»
5	<i>RB/Rpi-blb1</i> (VIII)	RB-629	F: GAATCAAATTATCCACCCCAACTTTTAAAT R: CAAGTATTGGGAGGACTGAAAAGGT	65	629	Pankin et al., 2011
6	<i>Rpi-blb2</i> (VI)	Blb2F/R	F: GGACTGGGTAACGACAATCC R: AGCACGAGTCCCCTAATGC	58	773	Lokossou et al., 2010
Markers linked to the genes conferring extreme resistance to PVY originating from <i>S. stoloniferum</i>						
7	<i>Ry<sub>sto</sub></i> (XII)	YES3-3A	F: TAACTCAAGCGGAATAACCC R: AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTGTC	55	341	Song, Schwarzfischer, 2008
8	<i>Ry<sub>f-sto</sub></i> (XII)	GP122-406/EcoRV	F: CAATTGGCTCCCGACTATCTACAG R: ACAATTGCACCACCTTCTCTTACG	52	406	Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008
Marker used for detection of different mt-types						
9	<i>rps 10</i> locus of mtDNA	ALM_4/ALM_5	AAT AAT CTT CCA AGC GGA GAG AAG ACT CGT GAT TCA GGC AAT	55	alpha – 2400, beta – 1600, gamma – “–”	Lössl et al., 2000



**Fig. 1.** A structure of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* gene and location of five gene-specific primers used in this study: Rpi-sto1, BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-629.

Bold lines indicate exon 1 (1–427 bp) and exon 2 (1107–3592 bp). Thin lines indicate intron, upstream and downstream regions. Nucleotide numbering begins from the start codon and includes the intron sequence. Regions corresponding to the CC-, NBS- and LRR- domains are highlighted in gray, light gray, and black, accordingly. The arrows show the regions of primer annealing; numbers under the arrows correspond to the position of the first nucleotide on the 5' end of the primers. The names of primers are indicated above the arrows.

European PVY resistant varieties (Song, Schwarzfischer, 2008; Valkonen et al., 2008). The different mitochondrial DNA types (mt-types) were identified with the specific primers ALM\_4/ALM\_5 developed by A. Lössl et al. (2000) (see Table 1).

The primers were synthesized by Evrogen (Moscow, Russia) (<http://evrogen.ru>). PCR reactions were performed in a total volume of 20 µl containing 40 ng DNA template, 1 × PCR reaction buffer (Dialat, <http://dialat.ru>) with 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM of each dNTP (Dialat), 0.2 µM of forward/reverse primer and 1 U Taq polymerase (Dialat). PCR-conditions for the *RB/Rpi-blb1* and *Rpi-sto1* gene-specific primer pairs were used as described in the original articles (see Table 1). PCR-conditions for primer pairs YES3-3A and GP122-406/EcoRV were modified by the use of the touchdown option.

Each PCR reaction was repeated at least three times. In the case of positive results with markers for gene *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*, MAS was repeated with independently extracted DNA samples. A reaction mixture with water instead of DNA template was used as a negative control. PCR products were separated by electrophoresis in 2.0 % agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized in UV light.

**Sequence analysis.** The Rpi-sto1- and BLB1 F/R-amplicons from the genotypes selected in MAS were purified with the Cleanup Standard Kit (Eurogen, #BC022, <http://evrogen.ru>) and sequenced in both directions on 24-capillary 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using equipment of Core Centrum 'Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology' in ARRIAM. Alignment of nucleotide sequences and their analysis were conducted using software Unipro UGENE

version 1.29.0 (Okonechnikov et al., 2012) and BioEdit Version 7.1.9 (Hall, 1999). The obtained sequences were compared against the ones of the NCBI nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## Results

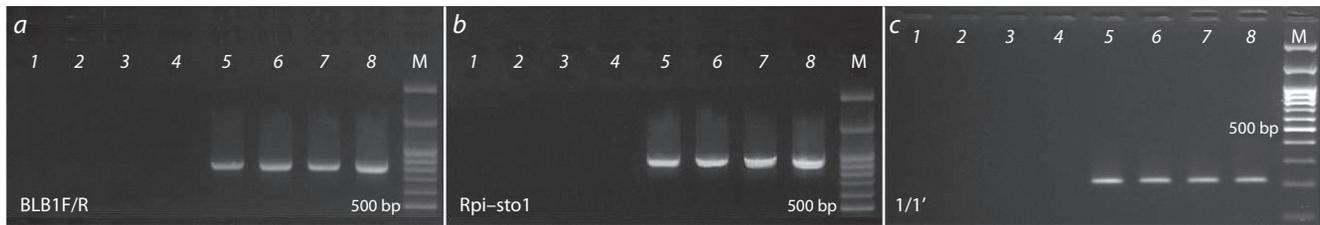
One hundred ninety one genotypes of the analyzed subset were screened using the DNA markers associated with the *Ry<sub>sto</sub>*, *Ry-f<sub>sto</sub>*, *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* genes and with mt-type gamma originating from *S. stoloniferum*. Based on the screening results this subset was divided into four groups A–D (Table 2).

Group A included 13 varieties all carrying the diagnostic markers GP122-406/EcoRV and YES3-3A\_321 tightly linked to the *Ry-f<sub>sto</sub>* and *Ry<sub>sto</sub>* genes. According to literature, these varieties are either extremely resistant or resistant to PVY; their pedigree records indicate that they descended from the *S. stoloniferum* hybrids (Simakov et al., 2007; Yashina et al., 2010; Biryukova et al., 2015). All the varieties of group A have mt-type gamma (see Table 2) inherited from *S. stoloniferum* (Lössl et al., 2000). These varieties were characterized by male sterility. None of the diagnostic markers for *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* and for *Rpi-blb2* were detected in group A.

**Table 2.** Molecular screening results in a subset of 191 accessions

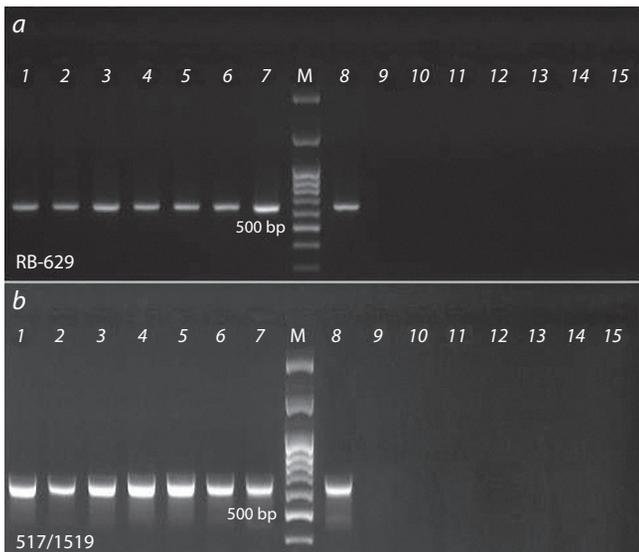
No.	Name of variety	Presence (1) or absence (0) of the diagnostic markers associated with the genetic material introgressed from <i>S. stoloniferum</i>							
		<i>Ry-f<sub>sto</sub></i>		<i>Ry<sub>sto</sub></i>		<i>RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1</i>			mt-type
		GP122-406/EcoRV	YES3-3A	Rpi-sto1	BLB1F/R	1/1'	517/1519	RB-629	ALM4/5
Group A: varieties with PVY – resistance genes markers and the mt-type gamma inherited from <i>S. stoloniferum</i>									
1	Brjanskij krasnyj	1	1	0	0	0	0	0	gamma
2	Il'inskij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
3	Jubilej Zhukova	1	1	0	0	0	0	0	gamma
4	Kolobok	1	1	0	0	0	0	0	gamma
5	Korona	1	1	0	0	0	0	0	gamma
6	Meteor	1	1	0	0	0	0	0	gamma
7	Moskvoreckij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
8	Nakra	1	1	0	0	0	0	0	gamma
9	Olimp	1	1	0	0	0	0	0	gamma
10	Pogarskij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
11	Resurs	1	1	0	0	0	0	0	gamma
12	Sokol'skij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
13	Vektar beloruskij	1	1	0	0	0	0	0	gamma
Group B: varieties with mt-type gamma with no diagnostic <i>R</i> genes markers									
1	Brjanskaja novinka	0	0	0	0	0	0	0	gamma
2	Fokinskij	0	0	0	0	0	0	0	gamma
3	Odissej	0	0	0	0	0	0	0	gamma
4	Zdabytak	0	0	0	0	0	0	0	gamma
Group C: varieties and breeding clones with the gene-specific markers of <i>RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1</i>									
1	Avrora	0	0	1	1	1	1	1	beta
2	Ognivo	0	0	1	1	1	1	1	beta
3	Baltijskij	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	beta*
4	Evraziya	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	gamma*
5	Sudarynja	1*	1*	1*	1*	1*	1	1	gamma*
6	Breeding clone 3602/28	0	0	1	1	1	1	1	gamma
7	Breeding clone 1604/16	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	gamma*
8	Breeding clone 1101/10	0*	0*	1*	1*	1*	1	1	alpha*
Group D: varieties with no DNA markers associated either with <i>R</i> genes or the mt-type introgressed from <i>S. stoloniferum</i> .									
1-166	The rest 166 of 188 varieties of the studied subset	0	0	0	0	0	0	0	49.4 % – alpha, 50.6 % – beta
Control accession									
	<i>S. stoloniferum</i> PI 205522	1	1	1	1	1	1	1	gamma

\* Taken from (Gavrilenko et al., 2018).



**Fig. 2.** PCR amplification of 821-bp, 890-bp, 213-bp fragments using gene-specific primers: BLB1F/R (a); Rpi-sto1 (b); 1/1' (c).

Varieties and breeding clones: 1 – Il'inskij; 2 – Meteor; 3 – Nakra; 4 – Pogarskij; 5 – Avrora; 6 – 3602/28; 7 – Ognivo; 8 – sto, PI 205522. M – molecular marker 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb DNA Ladder.



**Fig. 3.** PCR amplification of 629-bp and 651-bp fragments using RB-629 (a) and 517/1519 (b) gene-specific primers.

Varieties and breeding clones: 1 – Avrora; 2 – 3602/28; 3 – Baltijskij; 4 – Evraziya; 5 – 1604/16; 6 – Ognivo; 7 – Sudarynja; 8 – sto, PI 205522; 9 – Il'inskij; 10 – Meteor; 11 – Nakra; 12 – Pogarskij; 13 – Golubizna; 14 – Zhigulevskij; 15 – Veteran. M – molecular marker 100 bp + 1.5 Kb + 3 Kb DNA Ladder.

Group B included four varieties (Brjanskaja novinka, Fokinskij, Odissej, Zdabytak) that had no *R*-gene diagnostic markers (see Table 2). At the same time, all these varieties had the sterile mt-type gamma which derived from *S. stoloniferum* (Lössl et al., 2000). According to the pedigree records only one variety of group B – Brjanskaja novinka – had originated from the *S. stoloniferum* hybrids.

As group C we marked the genotypes with diagnostic fragments generated by five gene-specific markers of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*. Within the screened subset these markers were found in two varieties: Avrora, Ognivo and in breeding clone 3602/28 (Fig. 2 and 3; Table 2). The breeding material from LenNIISKh 'Belogorka' selected earlier for the presence of three gene-specific markers (Rpi-sto1, BLB1F/R and 1/1') (Gavrilenko et al., 2018) also was MAS-positive: two additional markers 517/1519 and RB-629 covering different regions of the target gene *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* were detected in varieties Baltijskij, Evraziya, Sudarynja (see Fig. 3) and in breeding clones 1101/10 and 1604/16. As a result, group C included eight genotypes (five varieties and three breeding clones) which all were MAS-positive for the five gene-specific

markers (BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-629, Rpi-sto1) of *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* homologues (see Table 2).

The *Rpi-blb2* diagnostic marker was detected in control variety Toluca but was not found in the analyzed subset including the control accession of *S. stoloniferum* PI 205522.

Group D included the most (166 or 86.9 %) varieties of the analyzed subset, which were MAS-negative for all markers associated with *R* genes from *S. stoloniferum* (see Table 2). Genotypes with mt-type gamma were also not found in this group. Eighty two varieties (49.4 %) of this group possessed mt-type alpha and 84 (50.6 %) – mt-type beta (see Table 2). It should be mentioned that several accessions of group D had the *S. stoloniferum*-hybrids in their pedigree records (see the Material part), e. g. there were seven cultivars extremely resistant to PVY (Brjanskij rannij, Effekt, Golubizna, Zhigulevskij, Ramzaj, Skoroplodnyi, Veteran) which had originated from self-fertile hybrid F<sub>2</sub>Bn of *S. stoloniferum* (Simakov et al., 2007; Yashina, 2010).

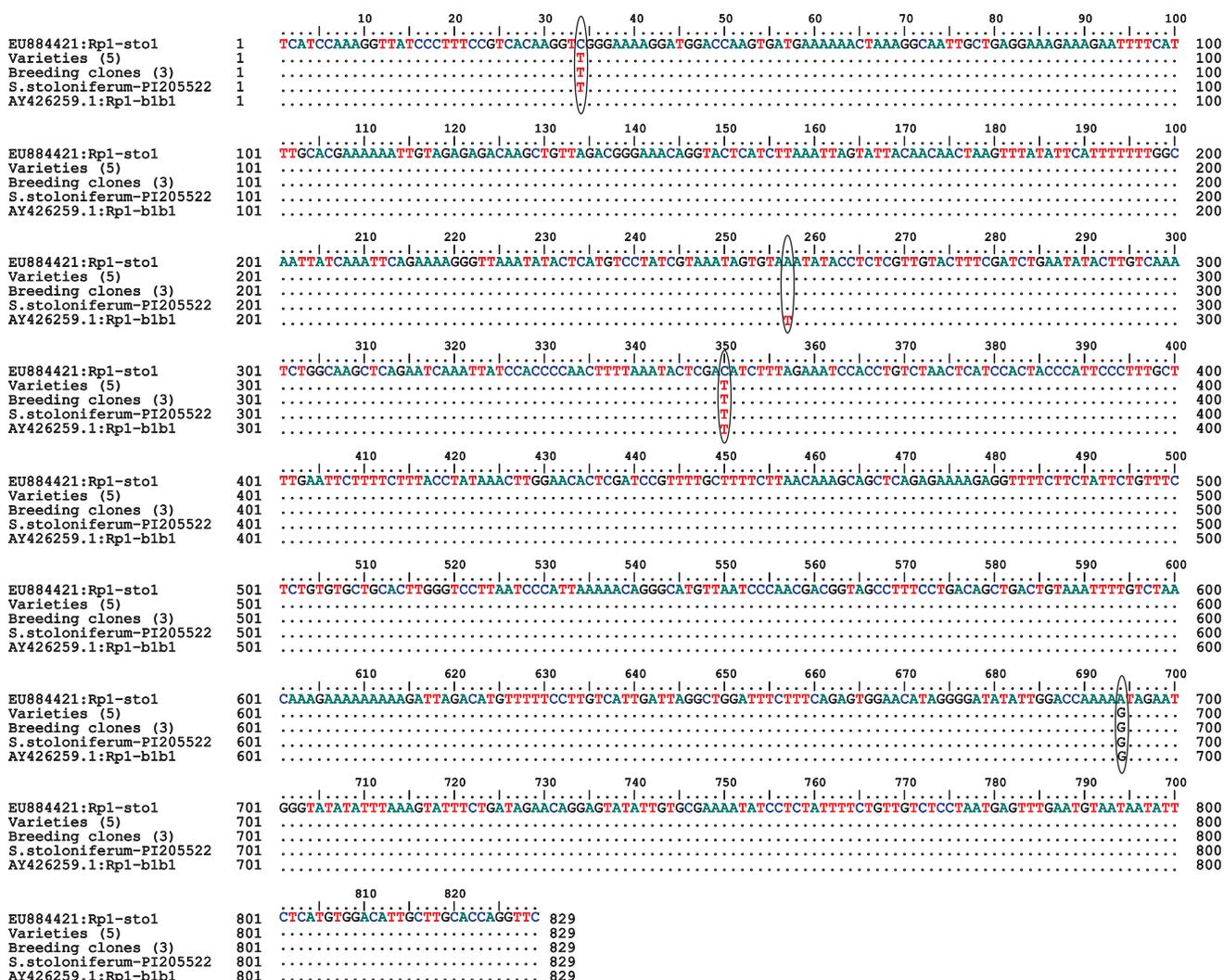
Seven varieties from the analyzed subset had been previously screened for marker GP122\_564 of the *Ry-f<sub>sto</sub>* gene – (Pavlyuchuk et al., 2013) and eight varieties – for YES3-3A marker of the *Ry<sub>sto</sub>* gene (Biryukova et al., 2015); in the both cases, material from patent holder institutions had been used. The results obtained at present study fully confirmed the data for these 15 varieties.

All the genotypes of group C, each carrying five gene-specific markers for the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*, were selected for further sequence analysis.

### Sequence analysis

The bands amplified by the Rpi-sto1 primer pairs were purified and sequenced from the eight genotypes of group C: five varieties (Avrora, Baltijskij, Evraziya, Sudarynja, Ognivo), three breeding clones (1101/10, 1604/16, 3602/28) and control genotype *S. stoloniferum* PI205522. The nucleotide sequences data obtained from the partial CC-region amplified with the Rpi-sto1 primer pairs were identical in all the nine genotypes (Fig. 4).

The identified variant of the nucleotide sequence of Rpi-sto1-fragments was not found in the GenBank database, but the sequences had 99 % similarity with the corresponding region of the two *R* gene sequences in the database: (1) *Rpi-sto1* of *S. stoloniferum* (EU884421) and (2) *Rpi-blb1* of *S. bulbocastanum* (AY426259.1). Both reference sequences correspond to the functional alleles (van der Vossen et al., 2003; Vleeshouwers et al., 2008). In comparison with corresponding region in reference sequence EU884421, three single-nucleotide po-



**Fig. 4.** Alignment of the *Rpi-sto1*-amplicon sequences from the eight genotypes of group C to the corresponding region of reference sequences (AY426259.1 and EU884421).

Varieties (5): Avrora, Baltijskij, Evraziya, Ognivo, Sudarynja; breeding clones (3): 1101/10, 1604/16, 3602/28. The ovals indicate the SNP-positions which correspond to the sites 315, 538, 631, 975 in the reference sequences.

**Table 3.** Single-nucleotide polymorphisms in the *Rpi-sto1*-amplicon sequences from eight MAS-positive genotypes of group C compared to the corresponding region of reference sequences *Rpi-sto1* (AY426259.1) and *Rpi-blb1* (EU884421)

Reference sequences (GenBank #)	8 genotypes selected in MAS:		
SNP position in sequence AY426259.1	<i>Rpi-blb1</i> (AY426259.1)	<i>Rpi-sto1</i> (EU884421)	5 varieties (Avrora, Baltijskij, Evraziya, Ognivo, Sudarynja), 3 breeding clones (1101/10, 1604/16, 3602/28) and control – <i>S. stoloniferum</i> PI 205522
315	C	C	T
538	T	A	A
631	T	C	T
975	G	A	G

polymorphisms were detected in the analyzed genotypes: one C → T – in the first exon at site 315 and two SNPs – in the intron part at sites: 631 (C → T) and 975 (A → G) (Table 3, Fig. 4).

Comparison with *S. bulbocastanum* reference sequence AY426259.1 revealed the same 1-bp substitution in the coding region at site 315 and one SNP – in the intron at site 538

(see Fig. 4, Table 3). Single nucleotide change at position 315 in the first exon resulted in synonymous codon substitution (GTC → GTT) that did not alter the encoded amino acid valine.

The amplicons generated by primer pair BLB1F/R from the partial LRR region were sequenced from control genotype *S. stoloniferum* PI 205522, varieties Avrora, Ognivo,

and breeding clone 3602/28. The sequences of BLB1F/R amplicons gave identity score 100 % to a corresponding partial LRR region in both reference sequences EU884421 and AY426259.1 and they were identical to the BLB1F/R fragment sequences from varieties Baltijskij, Evraziya, Sudarynja and breeding clones 1101/10, 1604/16 which had been analyzed earlier (Gavrilenko et al., 2018).

Thus, all the genotypes of group C had the same variant of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*-like sequences to be identical to the corresponding haplotype of *S. stoloniferum* PI 205522.

The sequences of the *Rpi-sto1*- and *Rpi-blb1*-PCR fragments were submitted to GenBank and are available under the accession numbers: MH518315, MH062177 (cv. Sudarynja); MH518316, MH062178 (cv. Evraziya); MH521008 (cv. Baltijskij).

## Discussion

Wild Mexican species *S. stoloniferum* is an important source of *R* genes for extreme resistance to PVY and for durable resistance against late blight as well as for unfavorable abiotic stresses, but the interspecific hybrids with this species are often male sterile that complicate conventional breeding (Ross, 1986; Ortiz, 1998). According to literature, many Western European varieties created by breeders in Germany, Holland and Poland through introgressive hybridization with *S. stoloniferum*, carry *Ry<sub>sto</sub>* and/or *Ry-f<sub>sto</sub>* genes conferring extreme resistance to PVY (Flis et al., 2005; Song, Schwarzfischer, 2008). Varieties with the *Ry<sub>sto</sub>* gene show male sterility associated with mt-type gamma. This is due to the fact that these European varieties originated from a few accessions of *S. stoloniferum* which had been used in initial interspecific crosses as a female parent. The varieties and breeding clones developed from such interspecific hybrids inherited both the valuable *Ry<sub>sto</sub>* gene and male sterile mt-type gamma (Lössl et al., 2000; Song, Schwarzfischer, 2008; Sanetomo, Gebhardt, 2015). Western European varieties have never been screened for the presence of *Rpi* genes, since the efforts of breeders were aimed at selection of PVY resistant material. An exception is our recent work in which a number of extremely resistant to PVY German varieties (Forelle, Kuba, Kuras, Maxi, Bettina, Amado, Solara) carrying *Ry<sub>sto</sub>* and mt-type gamma (Song, Schwarzfischer, 2008) were screened for the *Rpi-sto1* and BLB1F/R markers of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* gene, and none of these varieties were MAS-positive (Gavrilenko et al., 2018).

Similar results have been obtained at the present study with PVY resistant domestic varieties from group A carrying simultaneously the markers of the *Ry<sub>sto</sub>* and *Ry-f<sub>sto</sub>* genes. Eleven of the thirteen varieties were bred in VNIKH (Moscow region) based on the common sources derived from the Hungarian *S. stoloniferum* hybrid exhibiting extreme resistance to PVY (Simakov et al., 2007; Yashina, 2010). The hybrid maternally transferred its mt-type gamma to the breeding progenies. Cultivar Nakra from the group A had in its pedigree German variety Bison carrying the *Ry<sub>sto</sub>* gene and mt-type gamma as its female parent (Song, Schwarzfischer, 2008). The varieties of group A did not have the diagnostic markers of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* conferring broad-spectrum late blight resistance. It was obvious that in a breeding process aimed at the selection of PVY resistant genotypes with *Ry<sub>sto</sub>* and/or *Ry-f<sub>sto</sub>* genes (both localized on chromosome XII), the other

alien *S. stoloniferum* chromosomes (for example, VIII and VI, in which the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* and *Rpi-blb2* genes were mapped as well) would be lost.

The objective of creating varieties with high field resistance to late blight has been a priority for breeders from the north-western part of Russia, because in this region the weather conditions – moderate temperatures and high humidity – contribute to late blight development and often lead to epiphytotic. Seven of the eight selected in the MAS genotypes of group C having gene-specific markers for *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1* were developed by breeders from the North-Western region of Russia – LenNIISKh ‘Belogorka’ (Sudarynja, Evraziya, Baltijskij, 1101/10, 1604/16, 3602/28) and from the Vsevolozhskaya breeding station (Avrora). The patent holder of variety Ognivo is the Falenskaja breeding station located in the central-eastern part of European Russia.

The selected varieties and breeding clones from LenNIISKh ‘Belogorka’ grown without fungicide applications have been tested in the field trials for several years including epiphytotic seasons. The high level of foliar resistance to late blight was reported for Sudarynja, Baltijskij (Gavrilenko et al., 2018) and for 3602/28 (Evdokimova, not published). The Medium to low levels of field resistance was registered for Evraziya, Avrora and Ognivo (Simakov et al., 2009). At the same time all the genotypes of group C (Avrora, Baltijskij, Evraziya, Sudarynja, Ognivo, 1101/10, 1604/16, 3602/28) had an identical variant of the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*-like sequences with 99 % similarity to the corresponding regions of the *Rpi-sto1* and the *Rpi-blb1* genes from the Genbank database. These six genotypes from LenNIISKh ‘Belogorka’ had similar origin – they all derived from the same hybrid 8889/3 (*S. demissum-S. stoloniferum-S. andigenum*) (Gavrilenko et al., 2018). The pedigree of variety Avrora is unknown as well as the pedigree of Ognivo hybrids. The differences in the level of their late blight resistance can be influenced by the number of copies of resistance gene(s) or by gene interaction and genetic background. Further research is required to study the late blight resistance types in the genotypes from group C.

The undoubted success of breeders has been creation of the male fertile breeding material derived from the *S. stoloniferum* hybrids. The selected varieties and breeding clones of group C bred in LenNIISKH ‘Belogorka’ had originated from the same male fertile hybrid 8889/3. This hybrid was an effective pollinator and it had been always used in crosses as a male parent (Gavrilenko et al., 2018). Various mt-types in the descendants of hybrid 8889/3 were determined by the different female parents used in crosses. As a result, within the selected breeding material of group C there were male fertile genotypes: cultivar Baltijskij (mt-type beta), breeding clone 1101/10 (mt-type alpha) and genotypes with mt-type gamma exhibiting male sterility (Evrasiya, Sudarynja, 1604/16). Varieties Aurora and Ognivo selected in the present study both had mt-type beta, similar to cultivar Baltiysky from LenNIISKh ‘Belogorka’ (see Table 2). Varieties Avrora and Baltiysky are known as effective pollinators. Recently N. Zoteyeva et al. (2017) have selected male fertile *S. stoloniferum* hybrids with mt-type alpha and shown the possibility of pyramiding *R* genes from different wild Mexican species in breeding material.

As it has been mentioned before two conventionally bred varieties (Toluca and Bionica) possess the *Rpi-blb2* gene in-

trogged from *S. bulbocastanum* to common potato for a 46-year period (Haverkort et al., 2009). Additionally, the *Rpi-blb2* homolog has been detected in Hungarian cultivar White Lady (Hajianfar et al., 2016). The present paper represents a first report of finding the *RB/Rpi-blb1 = Rpi-sto1*-like sequences in conventional bred varieties. With further investigation of late blight resistant types, co-segregation and expression analysis, the selected breeding material of group C might be used for gene pyramiding through traditional breeding methodologies.

## Acknowledgements

The study was supported by the RSF grant (project No. 16-16-04125).

The authors are grateful to Dr. Alexandr Ermishin (Institute of Genetics and Cytology, Belarusian National Academy of Science, Republic of Belarus) for providing an *in vitro* clone of selected genotype *S. stoloniferum* PI 205522 and to Dr. Ramona Thieme (Julius Kühn-Institute, Germany) for the DNA sample of variety Toluca.

Growing of potato plants in VIR field Genbank is supported by the VIR project No. 0662-2018-0005.

Three varieties and three breeding clones from group C were bred in LenNIISKH 'Belogorka' under State Task # 007-00471-18-00.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Biryukova V.A., Shmyglya I.V., Abrosimova S.B., Zapekina T.I., Melshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V. Search for sources of genes for resistance to pathogens among samples of selection and genetic collections of VNIKKh using molecular markers. *Zashchita Kartofelya = Potato Protection*. 2015;1:3-7.
- Colton L.M., Groza H.I., Wielgus S.M., Jiang J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from a wild potato species. *Crop Sci*. 2006;46:589-594. DOI 10.2135/cropsci2005.0112.
- Elanskij S. Features of late blight in Russia. *Zashchita Kartofelya = Potato Protection*. 2015;1:8-11.
- Fact Series. A late blight resistance for Europe, 2014. [www.vib.be](http://www.vib.be).
- Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry-f<sub>sto</sub>* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. *Mol. Breed*. 2005;15(1):95-101. DOI 10.1007/s11032-004-2736-3.
- Fry W.E. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol*. 2008;9(3):385-402. DOI 10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x.
- Fry W.E., Goodwin S.B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis*. 1997;81(12):1349-1357. DOI 10.1094/PDIS.1997.81.12.1349.
- Fry W.E., Goodwin S.B., Dyer A.T., Matuszak J.M., Drenth A., Tooley P.W., Sujkowski L.S., Koh Y.J., Cohen B.A., Spielman L.J., Deahl K.L., Inglis D.A., Sandlan K.P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*; chronology, pathways and implications. *Plant Dis*. 1993;77(7):653-661.
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genet. Resour. Crop Evol*. 2013;60(7):1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.
- Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329 (in Russian).
- Goss E.M., Tabima J.F., Cooke D.E., Restrepo S., Fry W.E., Forbes G.A., Fieland V.J., Cardenas M., Grünwald N.J. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(24):8791-8796. DOI 10.1073/pnas.1401884111.
- Hajianfar R., Kolics B., Cernák I., Wolf I., Polgár Z., Tallér J. Expression of biotic stress response genes to *Phytophthora infestans* inoculation in White Lady, a potato cultivar with race-specific resistance to late blight. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 2016;93:22-28. DOI 10.1016/j.pmp.2015.12.001.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999;41:95-98.
- Hanneman R.E., Bamberg J.B. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. Madison: Univ. of Wisconsin, WI, USA, 1986.
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Visser R.G.F., van der Vossen E.A.G. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res.* 2008;51(1):47-57. DOI 10.1007/s11540-008-9089-y.
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh Project. *Potato Res.* 2016;59(1):35-66. DOI 10.1007/s11540-015-9312-6.
- Haverkort A.J., Struik P.C., Visser R.G.F., Jacobsen E. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 2009;52(3):249-264. DOI 10.1007/s11540-009-9136-3.
- Hawkes J.G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. London: Belhaven Press, 1990.
- Helgeson J.P., Pohlman J.D., Austin S., Haberlach G.T., Wielgus S.M., Ronis D., Zambolim L., Tooley P., McGrath J.M., James R.V., Stevenson W.R. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: A new source of resistance to late blight. *Theor. Appl. Genet.* 1998(6-7):96:738-742. DOI 10.1007/s001220050796.
- Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S. Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*. 1973;22(3):457-466. <http://evrogen.ru> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Jackson S.A., Hanneman R.E.Jr. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica*. 1999; 109(1):51-67. DOI 10.1023/A:1003710817938.
- Kostina L.I., Koroleva L.V., Kosareva O.S., Fomina V.E. Breeding potato varieties from Russia and near-abroad countries. Catalogue. Saint Petersburg, 2016. Issue 829:43.
- Levy A.V., Voronkova E.V., Poljuhovich Ju.V., Ermishin A.P. DNA markers of genes of resistance to late blight and Y-virus in samples of wild allotetraploid species of potato *Solanum stoloniferum*. *Vesci Nacyjnal'naj Akadzemii Navuk Belarusi*. 2017;2:46-54. DOI 10.29235/1029-8940-2017-0-2-46-54.
- Lokossou A.A., Rietman H., Wang M.Q., Krenke P., Schoot H., Henken B., Hoekstra R., Vleeshouwers V.G.A.A., Vossen E.A.G., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vosman B. Diversity, distribution, and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2010;23(9):1206-1216. DOI 10.1094/MPMI-23-9-1206.
- Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica*. 2000; 116:221-230. DOI 10.1023/A:1004039320227.

- Malcolmson J.F., Black W. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica*. 1966;15(2):199-203.
- Naess S.K., Bradeen J.M., Wielgus S.M., Haberalach G.T., McGrath J.M., Helgeson J.P. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101(5-6):697-704. DOI 10.1007/s001220051533.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Ortiz R. Potato breeding via ploidy manipulations. Ed. J. Janicks. *Plant Breeding Reviews*. New York: John Wiley & Sons, 1998. 16:15-86.
- Pankin A., Sokolova E., Rogozina E., Kuznetsova M., Deahl K., Jones R., Khavkin E. Allele mining in the gene pool of wild *Solanum* species for homologues of late blight resistance gene *RB/Rpi-blb1*. *Plant Genet. Res.* 2011;9(2):305-308. DOI 10.1017/S1479262111000414.
- Pavlyuchuk N.V., Voluevich E.A., Mahanko V.L., Ruseckij N.V. Method of multiplex PCR for the detection of potato genotypes, resistant to PVY and to PVS. [Potato-growing. Proc. RUE "Research and practical center of NAS of Belarus for potato, fruit and vegetable growing"]. 2013;21(1):184-192.
- Potatoes. Selection Potato Varieties of Russia and CIS Countries. Issue 829. Catalog of the world collection of VIR. SPb, 2016. (in Russian)
- Ross H. Potato Breeding – Problems and Perspectives. Berlin: V.P. Parey, 1986.
- Russian Varieties of Potatoes. Catalog. Cheboksary, 2011. (in Russian)
- Sanetomo R., Gebhardt C. Cytoplasmic genome types of European potatoes and their effects on complex agronomic traits. *BMC Plant Biol.* 2015;15:162. DOI 10.1186/s12870-015-0545-y.
- Simakov E.A., Anisimov B.V., Sklyarova N.P., Yashina I.M., Elanskiy S.N. Potato Cultivars in Russia. Moscow: Agrosplas, 2009. (in Russian)
- Simakov E.A., Yashina I.M., Sklyarova N.P. Potato breeding in Russia: history, general trends and achievements. Ed. A. Haverkort, B. Anisimov. *Potato Production and Innovative Technologies*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 2007;353-363. DOI 10.3920/978-90-8686-608-3.
- Simko I. Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species. *Am. J. Potato Res.* 2002;79:125-132.
- Song J., Bradeen J.M., Naess S.K., Raasch J.A., Wielgus S.M., Haberalach G.T., Liu J., Kuang H., Austin-Phillips S., Buell C.R., Helgeson J.P., Jiang J. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9128-9133. DOI 10.1073/pnas.1533501100.
- Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry<sub>sto</sub>*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *Am. J. Potato Res.* 2008; 85(2):159-170. DOI 10.1007/s12230-008-9012-8.
- Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hamalainen J.H., Marczewski W., Watanabe K.N. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to potato virus Y controlled by *Ry<sub>sto</sub>* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Ann. Appl. Biol.* 2008;152(1):121-130. DOI 10.1111/j.1744-7348.2007.00194.x.
- van der Vossen E.A.G., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J.* 2005;44(2):208-222. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x.
- van der Vossen E.A.G., Sikkema A., Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs J. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 2003;36(6):867-882. DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x.
- van Hove L., Gillund F. Is it only the regulatory status? Broadening the debate on cisgenic plants. *Environ. Sci. Eur.* 2017;29(1):22. DOI 10.1186/s12302-017-0120-2.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J.H., Champouret N., Oliva R., Segretin M.E., Rietman H., Cano L.M., Lokossou A.A., Kessel G.J.T., Pel M., Kamoun S. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu. Rev. Phytopatol.* 2011;49:507-531. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095326.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Rietman H., Krenek P., Champouret N., Young C., Oh S.K., Wang M., Bouwmeester K., Vosman B., Visser R.G.F., Jacobsen E., Govers F., Kamoun S., van der Vossen E.A.G. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE*. 2008;3(8):e2875. DOI 10.1371/journal.pone.0002875.
- Wang M., Sjeffe A., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G.A.A., van der Vossen E.A.G., Vosman B. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(7):933-943. DOI 10.1007/s00122-008-0725-3.
- Wastie R.L. Breeding for resistance. Eds. D.S. Ingram, P.H. Williams. *Phytophthora infestans, the Cause of Late Blight of Potato*. Vol. 7. *Advances in Plant Pathology*. London: Academic Press Ltd, 1991.
- Yashina I.M. The importance of variety in modern technologies of potato production. *Actual Problems of the Modern Potato Industry*. Cheboksary: PMC CR "Agro-Innovations", 2010;41-48.
- Zhu S., Li Y., Vossen J.H., Visser R.G., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Res.* 2012;21(1):89-99. DOI 10.1007/s11248-011-9510-1.
- Zoteyeva N., Antonova O., Klimenko N., Apalikova O., Carlson-Nilsson U., Karabitsina Yu., Ukhatova Yu., Gavrilenko T. Facilitation of introgressive hybridization of wild polyploid mexican potato species using DNA markers of R genes and of different cytoplasmic types. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017; 52(5):964-975.
- Zoteyeva N., Chrzanowska M., Flis B., Zimnoch-Guzowska E. Resistance to pathogens of the potato accessions from the collection of N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *Am. J. Potato Res.* 2012;89(4):277-293. DOI 10.1007/s12230-012-9252-5.

## ORCID ID

O.Yu. Antonova [orcid.org/0000-0001-8334-8069](https://orcid.org/0000-0001-8334-8069)  
N.S. Klimenko [orcid.org/0000-0002-5432-6466](https://orcid.org/0000-0002-5432-6466)  
Z.Z. Evdokimova [orcid.org/0000-0001-8413-1769](https://orcid.org/0000-0001-8413-1769)  
L.I. Kostina [orcid.org/0000-0002-6413-9189](https://orcid.org/0000-0002-6413-9189)  
T.A. Gavrilenko [orcid.org/0000-0002-2605-6569](https://orcid.org/0000-0002-2605-6569)



# ДНК-диагностика гена *RPV3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью

Е.Т. Ильницкая<sup>1</sup>✉, М.В. Макаркина<sup>1</sup>, С.В. Токмаков<sup>1</sup>, Л.Г. Наумова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко, Новочеркасск, Россия

Милдью – одно из наиболее распространенных грибных заболеваний виноградной лозы, вызываемое *Plasmopara viticola*. Эффективным способом контроля распространения патогена является возделывание устойчивых сортов. Сорта *Vitis vinifera*, считаясь основой высококачественного виноградарства, практически не обладают генетической устойчивостью к *P. viticola*. Поиск доноров устойчивости – важный этап в селекции. Один из крупных локусов устойчивости к милдью, ген *Rpv3*, впервые был определен в генотипе сложного межвидового гибрида винограда Бианка. Позже было установлено, что этот ген имеет семь гаплотипов устойчивости, наследуемых от североамериканских видов винограда, идентифицировать аллельное состояние гена можно с помощью ДНК-маркеров UDV305 и UDV737. В одной диплоидной форме могут быть объединены только два гаплотипа. С целью определения гена *Rpv3* в генофонде винограда с использованием указанных маркеров нами проведено изучение 35 генотипов различного происхождения, большинство из которых – межвидовые сорта. Три сорта, аллельное состояние гена *Rpv3* в которых известно, были включены в исследование в качестве референсных генотипов: Дунавский лазур, Ноа, Сейв Виллард 12-375. Работа проведена методом полимеразной цепной реакции с разделением продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза при использовании автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. В исследуемой выборке сортов винограда, согласно данным проведенного ДНК-маркерного анализа, ген *Rpv3* определен впервые в 16 генотипах межвидового происхождения, в том числе в ДНК 12 сортов идентифицирован гаплотип *Rpv3*<sup>299-279</sup>, в трех – *Rpv3*<sup>321-312</sup>, в одном сорте выявлен гаплотип *Rpv3*<sup>null-271</sup>. В большинстве идентифицированных нами генотипов, несущих *Rpv3*, донором гена является Сейв Виллард 12-375. Сорта винограда, в которых были идентифицированы гаплотипы *Rpv3*, определяющие устойчивость, характеризуются высоким или повышенным уровнем устойчивости к милдью. Полученные данные могут быть полезны в селекции устойчивых сортов винограда при подборе пар для гибридизации.

Ключевые слова: виноград; устойчивость к милдью; ген *Rpv3*; гаплотип; ДНК-маркеры; межвидовые гибриды.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В., Наумова Л.Г. ДНК-диагностика гена *RPV3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):703-707. DOI 10.18699/VJ18.413

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ilnitskaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Naumova L.G. DNA-marker based identification of the *RPV3* gene determining downy mildew resistance in grapevines. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):703-707. DOI 10.18699/VJ18.413

УДК 582.782.2:632.4.01

Поступила в редакцию 12.02.2018

Принята к публикации 24.06.2018

© АВТОРЫ, 2018

## DNA-marker based identification of the *RPV3* gene determining downy mildew resistance in grapevines

E.T. Ilnitskaya<sup>1</sup>✉, M.V. Makarkina<sup>1</sup>, S.V. Tokmakov<sup>1</sup>, L.G. Naumova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup> All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko, Novochechassk, Russia

Downy mildew is one of the most common fungal diseases of the vine, caused by *Plasmopara viticola*. An effective way to control the spread of the pathogen is to cultivate resistant varieties. Cultivars of *Vitis vinifera*, being the basis of high-quality viticulture, practically do not possess genetic resistance to *P. viticola*, so screening for resistance donors is an important stage in breeding. One of the major resistance loci to downy mildew, the *Rpv3* gene, was identified in the genotype of a complex interspecific hybrid of grapes Bianca. Later, it was found that this gene had seven haplotypes of resistance inherited from North American grape species, and that it was possible to identify the allelic status of the gene using DNA-markers UDV305, UDV737. However, only two haplotypes can be combined in one diploid form. To determine the *Rpv3* gene in the grape gene pool we, using these markers, studied 35 different genotypes of grapevines, most of which are interspecies cultivars. Three varieties with known allelic status of the *Rpv3* gene (Dunavski Lazur, Noah, Sayve Villard 12-375) were included in the study as reference genotypes. The genotypes were studied through polymerase chain reaction with separation of amplification products by capillary electrophoresis in automatic genetic analyzer ABI Prism 3130. In the studied grape cultivars DNA marker analysis identified the *Rpv3* gene in sixteen genotypes of interspecific origin, including haplotype *Rpv3*<sup>299-279</sup> found in twelve varieties, *Rpv3*<sup>321-312</sup> – in three, and haplotype *Rpv3*<sup>null-271</sup> – in one variety. Sayve Villard 12-375 turned out to be the donor of resistance gene in the most of the genotypes carrying *Rpv3* in this study. The obtained data can be useful in selection of mildew resistant grape varieties and screening for hybridization pairs.

Key words: grapevine; resistance to downy mildew; gene *Rpv3*; haplotype; DNA-markers; interspecific hybrids.

**М**илдью – одно из самых распространенных и вредоносных грибных заболеваний винограда, вызывается биотрофным оомицетом *Plasmopara viticola* Berl. et de Toni. Патоген имеет узкую специализацию – поражает только виноград: развивается на всех зеленых органах виноградной лозы – листьях, побегах, соцветиях, ягодах, усиках. При благоприятных для развития милдью условиях (теплый температурный режим и повышенная влажность) гибель урожая на разных сортах может составлять от 50 до 100 % (Талаш, 2010).

Один из наиболее эффективных методов контроля заболеваний – возделывание устойчивых сортов, что позволяет сократить количество пестицидных обработок, тем самым улучшить экологию ампелоценоза и пищевую безопасность конечной продукции, повысить рентабельность производства.

Процесс создания новых форм базируется на использовании генетического разнообразия культуры, а успех селекционных работ во многом определяется уровнем познания накопленного генофонда. Идентификация генотипов – доноров устойчивости – актуальная задача селекции. Сорта *Vitis vinifera*, будучи основой высококачественного виноградарства, практически не обладают генетической устойчивостью к *Plasmopara viticola*. Генотипы, устойчивые к милдью, принадлежат к видам винограда Северной Америки и Азии (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. riparia*, *V. rupestris* и др.), а также *Muscadinia rotundifolia* (Alleweldt et al., 1988; Wan et al., 2007).

В настоящее время молекулярно-генетические методы широко применяют для идентификации и картирования генов ценных признаков, анализа генетического разнообразия генофонда и ДНК-маркерного отбора в селекционных программах различных культур.

При использовании методов молекулярной генетики удалось определить порядка 20 локусов устойчивости к милдью в геноме винограда (<http://www.vivc.de>). Многие из них картированы, им присвоены имена, идентифицированы сцепленные ДНК-маркеры, в том числе пригодные для ДНК-маркерной селекции (Eibach et al., 2007; Di Gaspero et al., 2012; Schwander et al., 2012; Venuti et al., 2013; Zini et al., 2014; Ochssner et al., 2016).

Один из крупных локусов устойчивости, *Rpv3*, впервые был определен и локализован на 18-й хромосоме в генотипе сложного межвидового гибрида винограда Бианка, несущего в себе генплазму *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii* (Bellin et al., 2009). Позже при масштабном исследовании устойчивых североамериканских сортов и форм, обладающих геном *Rpv3*, было определено наличие семи консервативных гаплотипов этого гена, определяющих устойчивость к милдью (Di Gaspero et al., 2012). Идентифицированные гаплотипы отсутствовали у сортов *V. vinifera*. Авторы пришли к выводу, что ген *Rpv3* может быть найден в селекционных формах, имеющих в родословной несколько североамериканских видов. Ценные гаплотипы локализуются в одном локусе, по этой причине в традиционной селекции возможно комбинировать только два гаплотипа в одной диплоидной форме. В результате проведенных исследований были определены тесно сцепленные фланкирующие микросателлитные маркеры, позволяющие идентифицировать

гаплотипы *Rpv3* гена: UDV305, UDV737 (Di Gaspero et al., 2012). Так, устойчивые гаплотипы гена *Rpv3* соответствуют следующим аллельным состояниям локусов UDV305, UDV737: *Rpv3*<sup>299-279</sup> (наследуется от *V. rupestris*), *Rpv3*<sup>null-297</sup> (*V. rupestris* или *V. lincecumii*), *Rpv3*<sup>321-312</sup> (*V. labrusca* или *V. riparia*), *Rpv3*<sup>null-271</sup> (*V. labrusca* или *V. riparia*), *Rpv3*<sup>361-299</sup> (*V. rupestris*), *Rpv3*<sup>299-314</sup> (*V. rupestris*), *Rpv3*<sup>null-287</sup> (*V. rupestris* или *V. labrusca*). Более 200 сортов винограда проанализировано в исследованиях G. Di Gaspero с коллегами, определены генотипы, несущие устойчивые гаплотипы. Полученные данные могут быть использованы при подборе пар для гибридизации в селекции устойчивых сортов.

Цель настоящего исследования – идентификация аллельного состояния гена *Rpv3* в сортах винограда методом ДНК-маркерного анализа и сопоставление полученных данных с родословной генотипов.

### Материалы и методы

Работа проведена на 35 сортах винограда, сохраняемых в генофонде Анапской ампелографической коллекции (г. Анапа) и в коллекции Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко (г. Новочеркасск). Большинство сортов, включенных в исследование, – межвидовые гибриды, в том числе и отечественной селекции, среди родительских форм которых есть североамериканские виды винограда, и, согласно анализу родословной, они могут нести устойчивые гаплотипы гена *Rpv3*. В генплазме изучаемых сортов – потенциальных носителей исследуемого гена – присутствуют *V. riparia*, *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* и *V. lincecumii*. Было изучено также несколько генотипов, которые не должны обладать геном *Rpv3*, – сорта *V. vinifera* и их гибриды с амурским виноградом.

ДНК выделяли из молодых листьев типичных растений изучаемых сортов с применением методики на основе ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) (Rogers, Bendich, 1985). Изучение генотипов проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В исследовании использовали ДНК-маркеры, рекомендованные для идентификации аллельного состояния гена *Rpv3* (Di Gaspero et al., 2012). ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, согласно стандартному протоколу с применением реактивов производства ООО «Синтол» (Москва, Россия). Амплификацию ДНК осуществляли прибором Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) по следующей программе для каждого ДНК-маркера: 5 мин при 95 °С – начальная денатурация, далее 35 циклов: 10 с денатурация при 95 °С, 30 с отжиг праймеров при 55 °С, 30 с синтез при 72 °С; последний цикл синтеза – 3 мин при 72 °С. Разделение продуктов реакции методом капиллярного электрофореза и оценка размера амплифицированных фрагментов проведены с помощью автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner. В качестве контроля для уточнения размеров амплифицированных фрагментов в работу включали ДНК сортов Дунавски лазур, Сейв Виллар 12-375 и Ноа, размеры аллелей которых по изучаемым локусам известны (Di Gaspero et al., 2012).

Молекулярно-генетические исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия.

### Результаты и обсуждение

В ходе исследования определено аллельное состояние гена устойчивости к милдью *Rpv3* в генотипах 35 сортов вино-

града (таблица). Гаплотипы гена, определяющие устойчивость, идентифицированы в 19 сортах: Дунавски лазур, Ноа, Сейв Виллар 12-375, Декабрьский, Дунавска гымза, Оригинал, Талисман, Кутузовский, Кодрянка, Русбол, Сторгозия, R65, Кишмиш 342, Среброструй, VIII<sub>2</sub>-2-48, Армалага, Полюкс, Подарок Магарача, Мелоди (рисунок).

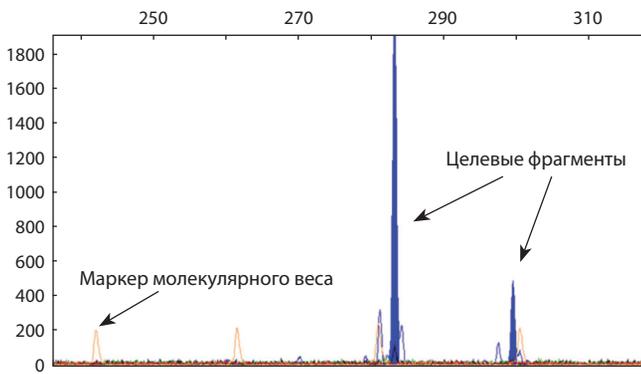
Гаплотип *Rpv3*<sup>299-279</sup> чаще других встречается в исследованной выборке сортов: он обнаружен в 14 генотипах

Результаты анализа генотипов винограда различного происхождения по микросателлитным локусам UDV305 и UDV737, сцепленным с *Rpv3* геном устойчивости к милдью\*

Сорт (форма)	Происхождение	UDV305 UDV737			
		Размер аллелей, п. н.			
Дунавски лазур	Ркацители × СВ 12-375	299	326	279	295
Ноа	<i>Vitis riparia</i> × <i>Vitis labrusca</i>	321	0	271	312
Сейв Виллар 12-375	Зейбель 6468 × Зейбель 6905	299	361	279	299
Декабрьский	Корна нягра × СВ 12-375	299		279	285
Дунавска гымза	(Мавруд × Пино нуар) × СВ 12-375	299		279	293
Оригинал	Дамасская роза × СВ 20-365	299	322	279	
Талисман	Фрумоаса албэ × Восторг	299	326	279	295
Кутузовский	Молдавский × СВ 20-365	299		279	285
Кодрянка	Молдова × Маршалский	299		279	285
Русбол	СВ 12-375 × Сверххранний бессемянный	299		279	
Сторгозия	(Мавруд × Пино нуар) × СВ 12-375	299		279	295
R65	Зала дендь × (Глория × Королева виноградников) × Мускат зимний	299		279	289
Кишмиш 342	СВ12-375 × Перлет	299	342	279	
Среброструй	Ркацители × СВ12-375	299	326	279	295
VIII <sub>2</sub> -2-48	Молдова × {Победа × [Катта-Курган × (Кишмиш розовый × Кишмиш белый)]}	299		279	
Армалага	(Армлонг × Малага)	321	334	271	312
Полюкс	Оберлен 595 ( <i>V. riparia</i> × Гаме черный) × Фостер Уайт сидлис	229	321	312	
Подарок Магарача	Ркацители × Магарач 2-57-72	321		297	312
Мелоди	Сейваль блан × Женева вайт 5 (Пино блан × Онтарио)	0		271	
Веста	(Августа × <i>V. amurensis</i> ) × (Кентавр магарачский × Левокумский)	231	285	293	297
В 7-2	<i>Vitis vinifera</i> × <i>Vitis labrusca</i>	0		295	312
Дойна	Корна нягра × (Каберне Совиньон × СВ 23-657)	290		279	285
Яловенский столовый	Ичкимар × СВ 20-366	299		281	295
Агадаи	Аборигенный дагестанский сорт <i>Vitis vinifera</i>	326		289	295
Альфа	<i>Vitis vinifera</i> × <i>Vitis riparia</i>	296		285	303
Антарис	Саперави × Цимлянский черный	326		301	295
Гранатовый	Саперави × Каберне-Совиньон	254		283	285
Голубок	Северный × (Вишневый + Одесский ранний + 1-17-54)	322		285	295
Дмитрий	Варусет × Гранатовый	254		285	295
Достойный	Филлоксероустойчивый Джемте × Мускат гамбургский	320		293	295
Красностоп АЗОС	Филлоксероустойчивый Джемте × Красностоп анапский	320		293	295
Муромец	Северный × Победа	342		285	
Поморийски бисер	Мискет червен × СВ 12-375	300		293	301
Цветочный	Северный × смесь пыльцы мускатных сортов	322	333	285	
Фиолетовый ранний	Северный × Мускат гамбургский	300		293	301

Примечание. СВ – Сейв Виллар.

\* Данные по идентифицированным аллелям приведены в соответствии с оформлением результатов исследования (Di Gaspero et al., 2012).



Визуализация результата фрагментного анализа продуктов ПЦР с маркером UDV737 сорта Сторгозия.

(см. таблицу), в том числе в 12 сортах *Rpv3*<sup>299-279</sup> идентифицирован впервые.

Гаплотип *Rpv3*<sup>321-312</sup> впервые определен в трех сортах: Армалага, Полюкс, Подарок Магарача. ДНК-маркерный анализ выявил гаплотип *Rpv3*<sup>null-271</sup> только в одном сорте (Мелоди). *Rpv3*<sup>321-312</sup> и *Rpv3*<sup>null-271</sup> несет также сорт Ноа, использованный в работе в качестве одного из референсных генотипов.

Гаплотип *Rpv3*<sup>299-279</sup>, идентифицированный нами в сортах Декабрьский, Дунавска гымза, Оригинал, Талисман, Кутузовский, Кодрянка, Русбол, Сторгозия, R65, Кишмиш 342, Среброструй, VIII<sub>2</sub>-2-48, наследуется из генплазмы *V. rupestris*, согласно опубликованным данным. В анализируемой выборке сортов шесть генотипов из двенадцати, в которых был обнаружен *Rpv3*<sup>299-279</sup>, унаследовали аллель устойчивости напрямую от родительской формы Сейв Виллар 12-375: сорта Декабрьский, Дунавска гымза, Русбол, Сторгозия, Кишмиш 342, Среброструй. Гибриды Сейв Виллара – сложные межвидовые гибриды, активно используются в селекции винограда как доноры устойчивости. Сейв Виллар 12-375 – один из наиболее известных гибридов этой серии, несет в себе генплазму *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* и *V. lincecumii*. В сорте Кодрянка и форме VIII<sub>2</sub>-2-48 гаплотип *Rpv3*<sup>299-279</sup> унаследован от родительского сорта Молдова (Гузаль кара × Сейв Виллар 12-375), т. е. донором гена является также Сейв Виллар 12-375. Согласно родословной форме R65 (Зала дендь (Сейв Виллар 12-375 × Жемчуг Саба) × (Глория × Королева виноградников) × Мускат зимний), аллель устойчивости унаследован от Сейв Виллар 12-375. Однако в сорте Поморийски бисер, одним из родителей которого считается Сейв Виллар 12-375, гаплотип гена *Rpv3*, влияющий на устойчивость к милдью, не обнаружен.

В генотипе сорта Талисман аллель, определяющий устойчивость, унаследован от сорта Фрумоаса албэ, один из родителей которого – Сейв Виллар 20-473. В сортах Оригинал и Кутузовский донор гена устойчивости – Сейв Виллар 20-365.

Считается, что гаплотип устойчивости *Rpv3*<sup>null-271</sup> происходит изначально из *V. labrusca* или *V. riparia*. Указанный гаплотип определен нами в сорте американской селекции Мелоди. Изначально, анализируя родословную сорта (Сейваль блан × Женева вайт 5 (Пино блан × Онта-

рио)) для включения его в работу как потенциального источника гена, мы предполагали, что донором устойчивости в генотипе Мелоди может быть Сейваль блан (синоним Сейв Виллар 5-276), в генетической формуле которого присутствуют *V. rupestris* и *V. aestivalis*. Однако, если исходить из того, что *Rpv3*<sup>null-271</sup> наследуется от *V. labrusca* или *V. riparia*, то указанный аллель устойчивости в сорте Мелоди унаследован от Онтарио (25 % *V. vinifera* + 75 % *V. labrusca*).

Гаплотип *Rpv3*<sup>321-312</sup> был определен в сортах Армалага, Полюкс, Подарок Магарача. Источники этого устойчивого гаплотипа, по литературным данным, – *V. labrusca* или *V. riparia*. В сорте Армалага *Rpv3*<sup>321-312</sup> унаследован от *V. labrusca*, в сорте Полюкс – от *V. riparia*, согласно происхождению сортов. Родословная сорта Подарок Магарача достоверно не определена. Одной из родительских форм, от которой предположительно и унаследована устойчивость, является Магарач 2-57-72 (Мцване × Сочинский черный). Сорт Сочинский черный утерян; первоначально он был найден П.Я. Голодригой в окрестностях г. Сочи, и его точное генетическое происхождение неизвестно, но по передаваемой им потомству высокой устойчивости к грибным патогенам считается, что это межвидовой гибрид. По полученным нами данным можно предположить, что в родословной этого сорта были *V. labrusca* или *V. riparia*.

## Заключение

Проведен анализ 35 генотипов винограда различного происхождения по исследованию наличия в них гена устойчивости к милдью *Rpv3* с использованием ДНК-маркеров UDV305, UDV737. В 19 сортах, согласно данным ДНК-анализа, обнаружен ген *Rpv3*, в том числе в ДНК трех сортов, информация о наличии гена у которых была опубликована ранее. Указанные маркеры позволяют идентифицировать определенный гаплотип устойчивости *Rpv3* гена. Так, в 12 генотипах винограда межвидового происхождения впервые определен гаплотип *Rpv3*<sup>299-279</sup>, в трех – *Rpv3*<sup>321-312</sup>, в одном сорте выявлен гаплотип *Rpv3*<sup>null-271</sup>. Данные о наличии гена устойчивости к милдью *Rpv3* в сортах винограда Декабрьский, Дунавска гымза, Оригинал, Талисман, Кутузовский, Кодрянка, Русбол, Сторгозия, R65, Кишмиш 342, Среброструй, VIII<sub>2</sub>-2-48, Армалага, Полюкс, Подарок Магарача, Мелоди получены впервые. Все генотипы, в которых были идентифицированы устойчивые гаплотипы *Rpv3*, характеризуются высоким или повышенным уровнем устойчивости к милдью, по многолетним наблюдениям (Петров, Талаш, 2010; Трошин, Радчевский, 2010).

Результаты исследования будут полезны в селекции винограда при подборе исходных форм с целью создания сортов с устойчивостью к милдью. По результатам ДНК-анализа можно предположить, что в родительских формах сорта Подарок Магарача, родословная которого не совсем ясна, могли быть межвидовые формы, несущие генплазму *V. labrusca* или *V. riparia*.

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Администрации Краснодарского края (грант № 16-44-230314 p\_a).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

- Петров В.С., Талаш А.И. Устойчивость сортов винограда к вредным организмам. Краснодар, 2010. [Petrov V.S., Talash A.I. Pest Resistance in Grape Varieties. Krasnodar, 2010. (in Russian)]
- Талаш А.И. Категории вредоносности вредителей и болезней на виноградниках. Плодоводство и виноградарство Юга России. 2010;4(3):24-29. [Talash A.I. Grades of pest harmfulness in vineyards. Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia. 2010;4(3):24-29. (in Russian)]
- Трошин Л.П., Радчевский П.П. Виноград: иллюстрированный каталог. Районированные, перспективные, тиражные сорта. Ростов н/Д., 2010. [Troshin L.P., Radchevskiy P.P. Grapevine: Illustrated Catalog. Released, Promising, and Mass-Production Varieties. Rostov n/D., 2010. (in Russian)]
- Alleweldt G., Possingham J.V. Progress in grapevine breeding. Theor. Appl. Genet. 1988;75:669-673.
- 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.
- Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., 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.
- 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.
- International Variety Catalogue VIVC. Julius Kuhn-Institut. <http://www.vivc.de>.
- Ochssner I., Hausmann L., Töpfer R. *Rpv14*, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinerea*. Vitis: J. Grapevine Res. 2016;55(2):79-81. DOI 10.5073/vitis.2016.55.79-81.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 1985;19(1):69-76.
- 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.
- Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Di Gaspero G. 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.
- Zini E., Raffener M., Di Gaspero G., Eibach R., Grando M.S., Letschka T. Applying a defined set of molecular markers to improve selection of resistant grapevine accessions. Acta Horticulturae. 2014; 1082:73-78. DOI 10.17660/ActaHortic.2015.1082.9.

# Влияние погодно-климатических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе

А.Ю. Новикова<sup>1, 2</sup>, И.В. Сеферова<sup>1</sup> ✉, А.Ю. Некрасов<sup>3</sup>, И.Н. Перчук<sup>1</sup>, Т.В. Шеленга<sup>1</sup>, М.Г. Самсонова<sup>2</sup>, М.А. Вишнякова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Кубанская опытная станция – филиал Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Краснодарский край, Гулькевичский район, пос. Ботаника, Россия

Для адресного подбора исходного материала в селекции на качество семян сои необходимо знание зависимости соответствующих характеристик семян от погодно-климатических условий в конкретном регионе. Определенное влияние на качество семян оказывает и глобальное изменение климата. Поэтому целью данной работы было выявление связи изменчивости содержания белка и масла в семенах сои с климатическими параметрами на Северном Кавказе, а также трендов этой изменчивости за длительный временной период. На основе изучения 1442 образцов сои из коллекции ВИР оценены тенденции изменчивости содержания белка и масла в семенах в условиях Краснодарского края за период 1987–2015 гг. Методом регрессионного анализа в разностях с последовательным включением переменных построены модели зависимости содержания белка и масла от обобщенных агрометеорологических показателей. В течение 1987–2015 гг. для периода с температурами выше 10 °C наблюдался рост сумм активных температур на 218 °C/10 лет и недостоверное уменьшение осадков на 20.9 мм/10 лет. В динамике содержания белка выявлен тренд к росту на 2.5 % за 10 лет, по содержанию масла достоверной тенденции нет. Наибольшее среднее содержание масла и наименьшее белка было у среднеспелых образцов (22.2 и 38.8 %), а относительно высоким содержанием белка характеризовались ранние (21.6 и 40.0 %) и поздние (20.2 и 39.9 %) образцы. Содержание белка росло с увеличением продолжительности периода с температурами выше 22 °C и уменьшалось с ростом осадков за период с температурами выше 18 °C. Накоплению масла в семенах способствовало увеличение гидротермического коэффициента за период с температурами выше 19 °C, у поздних сортов этому препятствовал длительный осенний период с температурами ниже 15 °C. Многолетний рост содержания белка обусловлен как изменением климата, так и генетическим улучшением сортов.

Ключевые слова: соя; белок; масло; изменения климата; Северный Кавказ.

## Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus

L.Yu. Novikova<sup>1, 2</sup>, I.V. Seferova<sup>1</sup> ✉, A.Yu. Nekrasov<sup>3</sup>, I.N. Perchuk<sup>1</sup>, T.V. Shelenga<sup>1</sup>, M.G. Samsonova<sup>2</sup>, M.A. Vishnyakova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Kuban Experiment Breeding Station, Branch of N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, village Botanika, Gul'kevichskii Region, Krasnodarskii Krai, Russia

For a targeted search of initial breeding material for the quality of soybean seeds, it is necessary to know the patterns of the dependence of the corresponding seed characters on the weather and climatic conditions in a particular region. Global climatic change, the concretization of which is relevant, has a share in this dependence. Thus, the aim of this work was to identify the relationship between the variability of protein and oil content in soybean seeds with climatic parameters in the North Caucasus as well as trends in this variability over a long time period. The study of 1442 soybean accessions from VIR collection in the Krasnodar region during 1987–2015 had been carried out and the tendencies of the variability of protein and oil content in seeds in this environment were estimated. The regression analysis in differences with forward stepwise selection of variables has been used to construct models for the dependence of the protein and oil content on generalized agrometeorological indices. During 1987–2015, for the period with temperatures above 10 °C, the sums of active temperatures increased by 218 °C/10 years and precipitation decreased by 20.9 mm/10 years. In the dynamics of protein content, a trend has been revealed as an increase by 2.5 % over 10 years, while there is no reliable trend in oil content. The maximum average mean of oil content and the smallest protein were in the middle-maturing accessions (22.2 and 38.8 %), and a relatively high protein content was detected, on average, in the early- (21.6 and 40.0 %) and late-maturing (20.2 and 39.9 %) varieties. The protein content had been increasing with a growth of the duration of the period with temperatures above 22 °C and decreasing with a raise in precipitation over a period of temperatures above 18 °C. The accumulation of oil in seeds was promoted by an increase of the hydrothermal coefficient over the period with temperatures above 19 °C, and, in late-maturing varieties, prevented by a prolonged

autumn period with temperatures below 15 °C. Long-term growth in protein content is due to both climatic change and genetic improvement of varieties.

Key words: soybean; protein; oil; climate change; North Caucasus.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Новикова Л.Ю., Сеферова И.В., Некрасов А.Ю., Перчук И.Н., Шеленга Т.В., Самсонова М.Г., Вишнякова М.А. Влияние погодноклиматических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):708-715. DOI 10.18699/VJ18.414

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Novikova L.Yu., Seferova I.V., Nekrasov A.Yu., Perchuk I.N., Shelenga T.V., Samsonova M.G., Vishnyakova M.A. Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):708-715. DOI 10.18699/VJ18.414 (in Russian)

**С**оя (*Glycine max* Merr.) – самая популярная в мире белково-масличная культура, имеющая широкий спектр применения. История сои – это история адаптации вида в условиях различных режимов увлажнения, температуры, длины дня и других климатических параметров. Народная, а затем и научная селекция сои первоначально была нацелена на повышение содержания масла в семенах. На это указывает само историческое название сои – масляничные бобы, а также данные из старых научных публикаций (Врочинский, 1935). За последние десятилетия селекционные усилия во всем мире сместились в сторону повышения содержания белка в семенах (Зеленцов, Мошненко, 2016). Согласно авторитетному источнику – оценочной базе данных коллекции сои Сельскохозяйственного департамента США, насчитывающей около 20 тыс. образцов, содержание белка в семенах культурной сои варьирует в пределах 31.7–57.9%, масла – 6.5–25.6% (USDA, 2018). Масштабные исследования коллекционных образцов сои, выполнявшиеся в ВИР, выявляли схожие интервалы этих показателей (Щелко и др., 1990).

Оптимальным для формирования генеративных органов и плодоношения сои считают среднесуточные температуры 18–22 °C (Белолобцев, Сенников, 2012). Наш анализ многолетних данных, основывающийся на регрессионных моделях хозяйственно ценных признаков сорта Комсомолка в условиях Краснодарского края, выявил, что главным погодноклиматическим фактором роста и развития сои является гидротермический коэффициент (ГТК), т. е. соотношение осадков и температур. Показано, что вегетационный период укорачивается с уменьшением ГТК при температурах выше 15 °C, а урожайность и высота растений положительно связаны с ГТК при температурах выше 10 °C (Сеферова и др., 2011).

Известно, что содержание белка и масла в семенах сои подвержено высокой генотипической и модификационной изменчивости. В литературе накоплено множество сведений о зависимости этих показателей от района возделывания культуры, генотипа сорта, группы спелости, использования разных приемов агротехники и т. п. Неоднократно показано, что в разных регионах земного шара гораздо более выражено влияние климата на содержание белка в семенах, чем на содержание масла (Ojo et al., 2002; Sudaric et al., 2006; Ермолина и др., 2011), и оба эти признака значительно варьируют в разных условиях выращивания (Piper, Boote, 1999; Bellaloui et al., 2015; Song et al., 2016).

Результаты, полученные ранее в Краснодарском крае, где проводилось и настоящее исследование, свидетель-

ствуют, что высокое содержание масла наблюдается при повышенном увлажнении и относительно невысокой температуре, а белка – при сухой погоде и повышенной температуре (Енкен, 1953; Мякушко, Баранов, 1984; Степанова, 1985; Баранов, Лукомец, 2005; Петибская, 2012). При этом отмечалось, что межсортовые различия содержания белка и масла у сои могут быть меньше межгодовых (Енкен, 1953). Выявление закономерностей взаимосвязи признаков и среды для определения оптимальных районов производства сои и выбора адаптивных сортов приобретает особую актуальность в связи с явными изменениями климата, отмечаемыми в том числе в районе нашего исследования (Зеленцов, Мошненко, 2012).

Качественный состав семян, кроме условий выращивания, зависит от целого ряда факторов, одним из которых является селекционное улучшение культуры. На современном этапе селекционеры уделяют значительное внимание повышению содержания как белка, так и масла в семенах сои. Получены сорта с содержанием белка в семенах 47–49%, а в отдельные годы до 50% при достаточно высокой продуктивности (Кочегура и др., 2005). Учитывая этот, а также ряд других факторов, включая агротехнику, для исследования влияния климата на признаки сельскохозяйственных культур необходимо вычленять именно погодноклиматические зависимости. Для этого используют методы исключения трендов из многолетних наблюдений, позволяющие существенно улучшить качество агрометеорологических регрессионных моделей (Kaukoranta, Nakala, 2008; Per et al., 2017). Одним из методов исключения трендов является анализ в разностях, т. е. анализ годовых приростов признаков (Елисеева, 2007; Сиротенко, 2012), не нашедший пока широкого применения в агрометеорологии. Анализ годовых приростов значений признаков был успешно использован для построения моделей динамики продолжительности вегетации, массы 1000 семян, высоты растения и урожайности сои в наших предыдущих исследованиях (Сеферова и др., 2011).

Цель данной работы – выявление связи изменчивости содержания белка и масла в семенах сои с агроклиматическими показателями на Северном Кавказе, а также трендов этой изменчивости за длительный временной период.

#### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 1442 образца сои из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР), происходящих из 35 стран. Выборка представлена преимущественно селекционными сортами. Исследование проводили в 1987–2015 гг. в

Краснодарском крае на филиале ВИР «Кубанская опытная станция» – КОС ВИР (45°13' с. ш., 40°47' в. д.). Ежегодно в исследование включали от 12 до 516 образцов. Каждый образец изучался на протяжении одного-трех лет. Наиболее продолжительными – 14 лет (1987–2000 гг.) были наблюдения за сортом Комсомолка, который являлся стандартом в полевой и биохимической оценке образцов. Измеряли содержание белка и масла в семенах, продолжительность вегетации. Использовали также данные по продуктивности, массе 1000 семян, высоте растений за 1987–2001 гг. Были использованы суточные данные метеопункта КОС ВИР.

Полевую оценку и измерения биохимических показателей проводили в соответствии с методическими указаниями ВИР (Корсаков и др., 1975; Вишнякова, 2010). До 2006 г. белок определяли по Кьельдалю ( $N \times 6.25$ ), масло – по массе сухого обезжиренного остатка в модификации Рушковского (Ермаков, 1987). С 2007 г. белок и масло определяли методом инфракрасной спектроскопии (NIR) на анализаторе Infratec 1241 Grain Analyzer (Швеция). Калибровочные кривые стандартизированы фирмой-производителем.

Рассчитано среднее по коллекции содержание белка и масла за каждый год. Определены тренды среднего по коллекции содержания белка и масла за период исследования, построены регрессионные модели этих показателей. Рассчитаны средние температуры и суммы осадков за месяцы с апреля по октябрь и обобщенные агрометеорологические показатели: даты перехода выше и ниже температур 10, 11, ... 22 °С, продолжительности периодов с температурами выше указанных пределов, суммы активных и эффективных температур, средние активные и эффективные температуры, ГТК этих интервалов. Эти показатели использованы в качестве переменных в регрессионных моделях. Методом регрессионного анализа с последовательным включением переменных построены модели зависимости содержания белка и масла от агроклиматических показателей. Из временных рядов исключен тренд за счет перехода к анализу годовых приростов показателей.

По *t*-критерию Стьюдента оценена достоверность различий биохимических показателей (и других хозяйственно ценных признаков) у образцов трех групп, выделенных по срокам созревания. В исследовании принят уровень значимости 5 %.

## Результаты

Среднее содержание белка в семенах образцов в изученной выборке (далее – коллекции) варьировало от 27.2 до 50.0 %, масла – от 15.2 до 26.6 % (рис. 1). Крайние пределы изменчивости составили для белка 23.8–51.1 %, для масла – 13.8–27.2 %. Содержание масла и белка в образцах обратно коррелированы, коэффициент корреляции  $r = -0.53$ . При увеличении масла в среднем на 1 % белок уменьшался на 1.1 %.

На рис. 1 отображены все выявленные в исследовании сочетания содержания белка и масла в семенах. В них суммируется как генетическая, так и средовая изменчивость образцов. Видно, что самые высокие значения белка соответствуют низким значениям масла. Этот вариант было

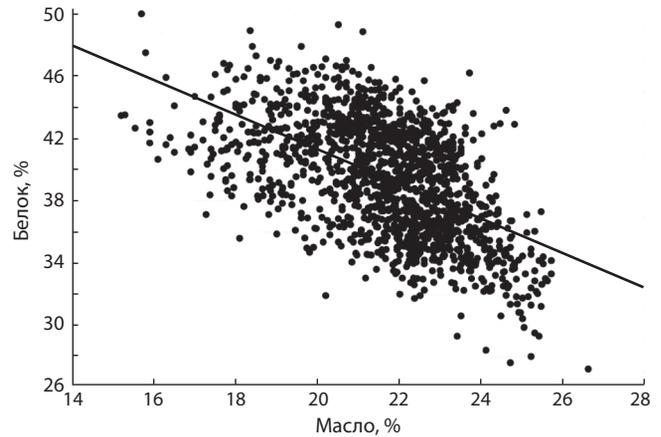


Рис. 1. Распределение образцов сои по содержанию белка и масла в семенах.

предложено называть липидно-деградационным (ЛД) (Зеленцов, Мошненко, 2016). Достаточно высокие значения белка приходится и на средние значения масла. Небольшое число образцов имеют одновременно высокие значения содержания белка и масла, т. е. относятся по определению цитируемых авторов к углеводно-деградационному варианту (УД), поскольку снижается количество углеводов. Высокое содержание масла выявляется как при УД варианте, так и при средних значениях содержания белка. Наиболее высокие значения масла соответствуют низким значениям по белку. Этот вариант мы предлагаем назвать протеин-дефицитным (ПД).

В 1987–2015 гг. на Кубанской ОС наблюдался достоверный рост сумм активных температур (выше 10 °С) на 218 °С/10 лет и слабое уменьшение осадков – на 20.9 мм/10 лет.

Отмечалась достоверная тенденция к росту среднего по коллекции содержания белка со скоростью 2.5 %/10 лет; доля масла снижалась незначительно – на 0.1 %/10 лет (рис. 2). Рост белка в семенах мог определяться тремя причинами: изменениями климата, обогащением коллекции высокобелковыми образцами современной селекции и агротехникой. Учитывая, что изучение коллекции выполнялось на КОС ВИР все годы по единой методике, возможное влияние изменения агротехники было исключено из рассмотрения.

Для выявления селекционного тренда сравнили динамику среднего по исследуемой выборке и сорта-стандарта Комсомолка в 1987–2000 гг. За этот период содержание белка и масла в семенах сорта Комсомолка не имело достоверных трендов. Среднее по коллекции содержание белка достоверно увеличивалось на 5 % за 10 лет (рис. 3, а). Это свидетельство вклада селекции в увеличение содержания белка и отсутствие такового в увеличении масличности. Для выявления погодноклиматических зависимостей были рассчитаны приросты всех исследуемых показателей за год (разности) (см. рис. 3, б). Корреляции приростов среднего по коллекции и сорта Комсомолка достигли: для белка  $r = 0.90$ , для масла  $r = 0.88$ .

Регрессионный анализ показал, что содержание масла ( $C_o$ ) положительно зависело от ГТК за период с температурами выше 19 °С ( $ГТК_{19}$ ) и отрицательно – от про-

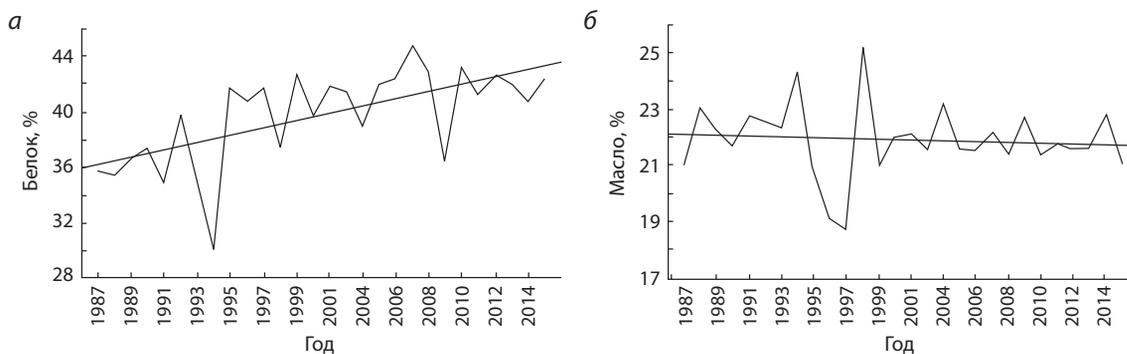


Рис. 2. Динамика среднего по коллекции содержания белка (а) и масла (б). Кубанская опытная станция, 1987–2015 гг.

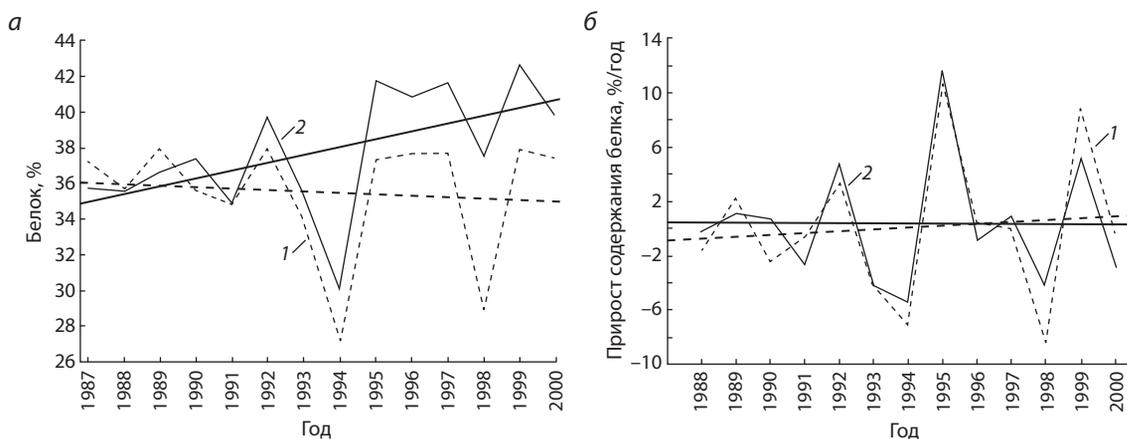


Рис. 3. Динамика содержания белка в семенах у сорта Комсомолка (1) и среднего по коллекции (2): а – исходные уровни; б – годовые приросты.

должительности вегетации в осенний период при температурах 15–10 °С ( $L_{15-10}$ ):

$$\Delta C_o = -0.012 + 0.951ГТК_{19} - 0.041L_{15-10}, R^2 = 0.49. (1)$$

Здесь  $\Delta$  – годовой прирост показателя,  $R^2$  – коэффициент детерминации уравнения.

Главным фактором изменчивости содержания белка ( $C_p$ ) является продолжительность периода с температурами выше 22 °С ( $L_{22}$ ). Осадки за период с температурами выше 18 °С ( $P_{18}$ ) снижают содержание белка:

$$\Delta C_p = -0.201 + 0.092\Delta L_{22} - 0.010\Delta P_{18}, R^2 = 0.65. (2)$$

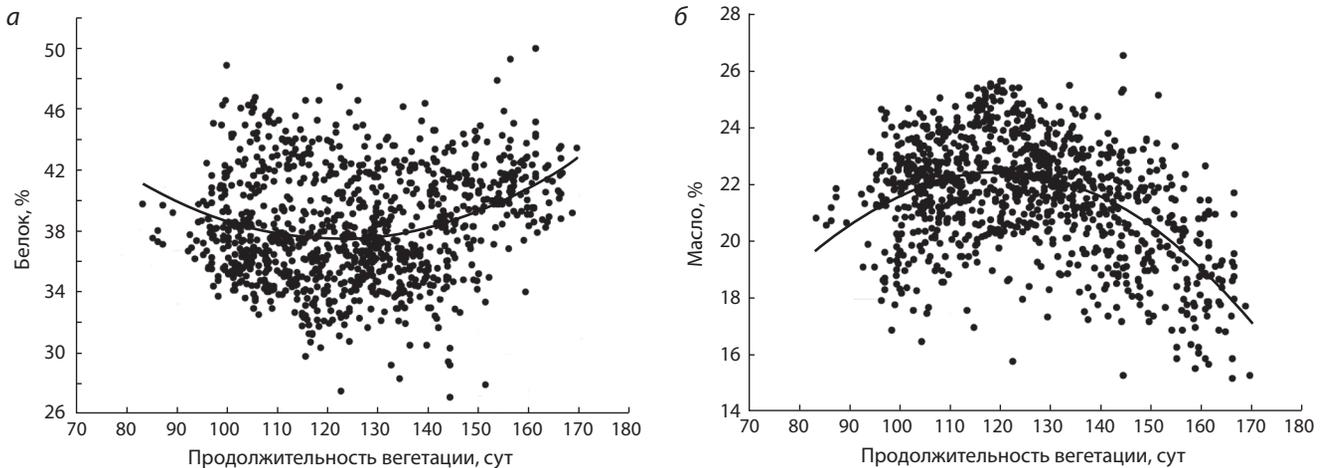
Объясненная уравнением доля межгодовой изменчивости составила 65 %. Расчет частных коэффициентов детерминации показал, что температурный фактор определял 44 % изменчивости, осадки – 21 %. То есть рост осадков при температурах выше 18–19 °С способствует формированию масла и, соответственно, снижению доли белка. В период с температурами выше 22 °С, напротив, накопление масла сокращается и процентное соотношение смещается в сторону белка. Продолжительный период роста при температурах ниже оптимальных 15 °С в осенний период также приводит к уменьшению содержания масла и увеличению процентного содержания белка у поздних сортов. Полученные результаты подтверждают, что накопление масла успешно проходит в интервале

оптимальных для формирования генеративных органов и плодоношения сои температурах 18–22 °С и увеличивается с ростом ГТК<sub>19</sub>.

По формулам (1) и (2) рассчитаны скорости изменения содержания белка и масла, объясняемые изменениями климата. В 1987–2015 гг. скорости изменения агрометеорологических факторов, значимых для биохимических показателей сои, составили:  $\Delta L_{22} = 21.1$  сут/10 лет,  $\Delta P_{18} = 31.1$  мм/10 лет;  $\Delta L_{15-10} = -1.8$  сут/10 лет,  $\Delta ГТК_{19} = 0.016$  ед./10 лет. Расчетный климато-обусловленный тренд (без учета свободного члена, отражающего неклиматические воздействия) составляет для содержания белка 1.6 % за 10 лет, а для содержания масла – 0.1 %. Таким образом, из фактически наблюдающегося повышения содержания белка на 2.5 %/10 лет, 1.6 % объясняются изменениями климата, а остальные 0.9 % можно отнести к успехам селекции.

Выявленные закономерности изменчивости биохимических показателей семян сои от тепло- и влагообеспеченности, полученные при анализе межгодовой изменчивости, подтверждаются зависимостью содержания белка и масла от продолжительности вегетации. Показано, что эти показатели нелинейно связаны с продолжительностью вегетации образцов (рис. 4).

Для дальнейшего анализа изучаемый набор был разделен на три группы по продолжительности вегетации



**Рис. 4.** Зависимость содержания белка (а) и масла (б) в семенах сои от продолжительности вегетации в условиях Кубанской опытной станции ВИР. Зависимость аппроксимирована полиномом второго порядка.

Характеристики групп сортов сои различных сроков созревания, КОС ВИР, 1987–2001 гг.

Вегетация, сут	Продуктивность, г/растение	Масса 1000 семян, г	Высота растения, см	Белок, %	Масло, %
80–110	20.1 ± 8.0	164.6 ± 23.8	67.3 ± 18.2	40.0 ± 3.6	21.6 ± 1.5
111–140	26.0 ± 8.5	166.8 ± 29.0	83.0 ± 14.8	38.8 ± 3.8	22.2 ± 1.6
141–170	26.9 ± 11.6	178.8 ± 46.7	88.4 ± 15.9	39.9 ± 3.4	20.2 ± 2.1
Всего	24.9 ± 9.8	170.0 ± 34.9	81.0 ± 17.8	39.4 ± 3.7	21.7 ± 1.8

Примечание. Указано среднее значение и стандартное отклонение.

(см. таблицу), которые можно определить как скороспелая (вегетация 80–110 сут), среднеспелая (111–140 сут) и позднеспелая (141–170 сут). Наибольшее среднее содержание масла – 22.2 % и наименьшее белка – 38.8 % были у среднеспелой группы, характеризующейся высокой продуктивностью – 26.0 г/растение и средним значением высоты растений – 83 см. Ранние образцы имели самое высокое содержание белка – 40.0 %, более низкое масла – 21.6 %, меньшую высоту растения и продуктивность. Образцы позднеспелой группы характеризовались высоким содержанием белка – 39.9 % и меньшим содержанием масла – 20.2 %, а также наибольшей высотой растений и наибольшей массой 1000 семян, а по продуктивности не отличались достоверно от среднеспелой группы.

**Обсуждение**

Широкий спектр использования сои требует создания специализированных сортов. Расширение ее производственного ареала, которое произошло в РФ в последние 10–15 лет, вызывает необходимость получения сортов разных групп спелости, оставляя приоритет за скороспелыми. При этом селекция любых сортов ориентирована на высокое качество семян, а именно на высокое содержание белка и масла – признаков, подверженных модификационной изменчивости.

В нашем исследовании, проводившемся на Северном Кавказе в течение 29 лет, выяснилось, что постоянно меняющиеся погодные условия и глобальные изменения климата способствуют повышению содержания белка в семенах. В целом по коллекции рост содержания белка

в семенах происходил со средней скоростью 2.5 % за 10 лет. В этот показатель, несомненно, вносит вклад и селекционное улучшение культуры. Об этом можно судить, сравнивая данные по изученной выборке с данными по сорту Комсомолка, используемому в течение 1987–2000 гг. в качестве стандарта. За этот период содержание белка и масла в семенах данного сорта не имело достоверных трендов. Полученные регрессионные модели содержания белка и масла объясняют 65 и 49 % межгодовой вариативности этих показателей соответственно. Согласно расчетам, вклад климатического фактора в рост белка составил 1.6 % за 10 лет, а 0.9 % можно отнести на счет пополнения коллекции современными сортами с генетически обусловленным более высоким содержанием белка. При этом увеличение содержания белка происходило на фоне роста сумм активных температур выше 10 °C на 218 °C/10 лет.

В США, главной соеосеющей стране мира, при изучении влияния целого ряда факторов на биохимические показатели семян сои было доказано, что среда – самый важный источник изменчивости содержания белка и масла (Bellaloui et al., 2015). В созданной в США унифицированной системе тестирования сортов сои было проведено самое длительное определение долговременных трендов в содержании белка и масла в семенах, продолжавшееся 51 год (1948–1998) (Yaklich et al., 2002). Работа велась на современных для соответствующих периодов сортах из всех регионов производства сои, включая южные провинции Канады, и всех групп спелости по американской классификации, принятой в те годы: с 00 по VIII. К со-

жалению, в исследовании не учитывались многолетние изменения климата, поскольку главной задачей было сравнение трендов в разных регионах и в разных группах спелости. Максимальное содержание белка (41.4 %) было зафиксировано у самых позднеспелых сортов, наибольшее количество масла (21.0–21.1 %) – у сортов II–IV групп спелости, которые при соотношении с нашей системой можно назвать среднеспелыми. Максимальное соотношение белок : масло (2.00–2.04) выявлено у сортов самых скороспелых групп 00–I, что свидетельствует о преобладании белка, а минимальное (1.99) – у самых позднеспелых групп VII и VIII, что свидетельствует о небольшом превышении у них масла по отношению к белку.

Эти результаты находятся в близком соответствии с полученными нами данными в отношении самых скороспелых и среднеспелых групп. В нашем исследовании ранние сорта имели белок на уровне  $40.0 \pm 3.6$  % и сравнительно высокое масло –  $21.6 \pm 1.5$  %. В данных системы тестирования США три самые скороспелые группы имели практически сравнимое с зафиксированным нами содержание белка – 40.4–40.9 %, но меньшее количество масла – 19.8–20.5 %. Наибольшим содержанием масла в Краснодарском крае ( $22.2 \pm 1.6$  %) и наименьшим – белка ( $38.8 \pm 3.8$  %), как и в работе американских авторов (Yaklich et al., 2002), характеризовалась группа среднеспелых образцов с продолжительностью вегетации 111–140 сут. Однако самые позднеспелые группы в США имели большее значение обоих показателей – 41.4 % белка и 20.9 % масла по сравнению с позднеспелыми в Краснодарском крае – 39.9 и 20.2 % соответственно. Это можно объяснить тем, что при более длительном вегетационном периоде у сортов VII–VIII групп спелости (200–220 сут), к примеру в южном штате Миссисипи, средние суточные температуры ноября – время уборки сои – составляют около  $14$  °C (Usual Planting..., 1997), что сравнимо со среднесуточными температурами начала октября – сезона уборки позднеспелых сортов в Краснодарском крае. То есть синтез белка и масла в США не лимитируется низкими температурами октября–ноября и продолжается на 30–50 сут дольше.

Как в нашем исследовании, так и по данным других авторов содержание белка повышается с ростом температур (Sato, Ikeda, 1979; Wolf et al., 1982; Pipper, Boote, 1999; Song et al., 2016). Показано, что при дневных температурах выше  $28$  °C содержание белка увеличивалось линейно с температурой (Dornbos, Mullen, 1992; Gibson, Mullen, 1996).

Оптимальными среднесуточными температурами для синтеза масла в течение 29 лет наших наблюдений были  $18$ – $22$  °C. Рост осадков при температурах выше  $18$ – $19$  °C способствует повышению содержания масла в семенах. Температуры выше  $22$  °C и ниже  $15$  °C (в осенний период) приводили к сокращению накопления масла и, соответственно, увеличению процентного содержания белка.

В публикациях американских ученых (Sato, Ikeda, 1979; Wolf et al., 1982) показано, что содержание масла в семенах сои повышалось до температуры  $22$  °C и после этого выходило на плато. Большое значение для синтеза масла имеет увлажнение. Если в условиях засухи повышается содержание белка, то при повышении влаж-

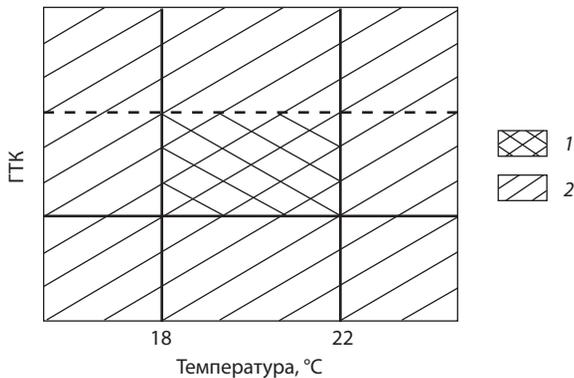
ности при благоприятных для этого температурах (выше  $18$ – $19$  °C) увеличивается синтез масла (Лещенко и др., 1985; Dornbos, Mullen, 1992).

В цитируемой нами работе о долговременных трендах качества семян в США (Yaklich et al., 2002) приводятся данные о двадцатилетнем периоде с середины 1950-х до середины 1970-х гг., называемом *benign climate period* – периодом плодоносным, с благотворным или мягким климатом. В эти годы средняя температуры июля–августа была на  $2$  °C ниже средней многолетней, а количество осадков выше. Значительно возросла урожайность многих культур, а у сои, кроме этого, увеличилось более чем на 1.5 % среднее содержание масла в семенах (Andresen et al., 2001). Однако в последующие годы для содержания масла не обнаруживалось какого-либо устойчивого тренда, и, напротив, с 1974 г. оно уменьшалось по необъясненным в публикации причинам (Yaklich et al., 2002).

Различие содержания белка и масла в семенах разных групп спелости можно трактовать, исходя из особенностей метаболизма семян. Синтез белков в семенах сои начинается на 10–15 сут раньше, чем накопление жирных кислот (Кочегура и др., 2005). У скороспелых сортов период налива семян укорочен, и запасующие ткани семядолей, как правило, успевают накопить белок, но не полностью реализовать свой масличный потенциал, что определяет меньшее накопление масла и, соответственно, большую долю белка в семенах. Кроме того, налив семян у скороспелых сортов происходит в Краснодарском крае в условиях высоких температур (выше  $22$  °C), что, как мы выявили, неблагоприятно для синтеза масла. Сорта средних сроков созревания наливаются в условиях с меньшими температурами, поэтому содержание масла оказывается наиболее высоким, пропорционально несколько сокращается содержание белка. У позднеспелых образцов низкие температуры сентября–октября ( $10$ – $15$  °C) снижают накопление масла, поэтому содержание белка повышается. О максимальном накоплении масла в сортах сои среднеспелых групп свидетельствует также исследование, проведенное в Ростовской области РФ (Ермолина и др., 2011). В условиях Аргентины наибольшее содержание масла наблюдалось также у среднеспелых групп II–IV по американской системе (Dardanelli et al., 2006).

В отличие от белка, содержание масла в семенах сои за 29 лет наших наблюдений не показало какого-либо значимого тренда. Аналогичные результаты были получены при испытаниях, проведенных в разных регионах Африки: показано, что независимо от района исследования, влияние климата на содержание белка в семенах сои гораздо более выражено, чем на содержание масла (Ojo et al., 2002).

Итоговая гипотеза, предлагаемая нами как обобщение проанализированных данных, в виде схемы отображена на рис. 5. В благоприятных условиях масло накапливается и достигает генетически обусловленного максимума. Эти условия (среднесуточная температура  $18$ – $22$  °C при достаточном увлажнении) соответствуют оптимальным для формирования урожая семян сои (Белолюбцев, Сенников, 2012). В менее благоприятных условиях масло накапливается не полностью, а доля белка в семенах становится больше. Конкретные значения ГТК не были рассчитаны, так как на рост растений влияют не только атмосферные



**Рис. 5.** Схема зависимости содержания масла в семенах сои от среднесуточной температуры воздуха и гидротермического коэффициента: благоприятные (1) и неблагоприятные (2) для накопления масла условия.

осадки, но и запасы доступной почвенной влаги. Мы предполагаем возможность избыточного увлажнения, но в нашем исследовании такие варианты не были зафиксированы. В генофонде сои имеется изменчивость по чувствительности к учитываемым параметрам, что делает возможным отбор генотипов для селекции в различных регионах.

Зависимость биохимических признаков семян сои, в частности изменчивость содержания белка и масла от погодных условий и изменений климата, показана нами для определенного региона РФ – Северного Кавказа. Выявленные вновь и подтвержденные нами известные ранее закономерности могут быть полезны для выбора регионов производства сои для конкретных целей: получения преимущественно белка или масла. При этом целесообразно подбирать в генофонде соответственно высокобелковые или высокомасличные формы определенных групп спелости.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке субсидии в целях реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.575.21.0136 от 26.09.2017) на базе уникальной научной установки Коллекция генетических ресурсов растений ВИР.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

Баранов В.Ф., Лукомец В.М. (ред.). Соя. Биология и техника возделывания. Краснодар: Сов. Кубань, 2005. [Baranov V.F., Lukomec V.M. (Ed.). Soybean: Biology and Technology of Cultivation. Krasnodar: Sovetskaya Kuban' Publ., 2005. (in Russian)]  
 Белолюбцев А.И., Сенников В.А. Биоклиматический потенциал экосистем. М.: РГАУ-МСХА, 2012. [Belolyubcev A.I., Sennikov V.A. Bioclimatic Potential of Ecosystems: Manual. Moscow: Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 2012. (in Russian)]  
 Вишнякова М.А. (ред.). Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение. СПб.: ВИР, 2010. [Vishnyakova M.A. (Ed.). Collection of

World Genetic Resources of Grain Legumes in VIR: Enlargement, Preservation, and Investigation. St. Petersburg: VIR Publ., 2010. (in Russian)]

Врочинский И.Д. Селекционные работы Харбинского опытного поля КВЖД. Работа агрономической части земельного отдела Кит. Вост. жел. дор. за 12 лет (1922–1933 гг.). Харбин, 1935;251-299. [Vrochinskij I.D. Breeding works of the Harbin experimental field of CER. Work of the Agronomical Branch of the Land Department of CER over 12 years (1922–1933). Harbin, 1935;251-299. (in Russian)]  
 Елисеева И.И. (ред.). Эконометрика. М.: Финансы и статистика, 2007. [Eliseeva I.I. (Ed.). Econometrics. Moscow: Finansy i Statistika Publ., 2007. (in Russian)]  
 Енкен В.Б. Соя. Народнохозяйственное значение. Зерновые бобовые культуры. М.; Л.: Сельхозгиз, 1953;174-220. [Enken V.B. Soybean. Economic value. In: Grain Legumes. Moscow; Leningrad: Sel'khozgiz Publ., 1953;174-220. (in Russian)]  
 Ермаков А.И. (ред.). Методы биохимического исследования растений. Л., 1987. [Ermakov A.I. (Ed.). Methods of Biochemical Evaluation of Plants. Leningrad, 1987. (in Russian)]  
 Ермолина О.В., Антонов С.И., Короткова О.В. Изменение качества семян сои в процессе селекции на Дону. Зерновое хоз-во России. 2011;6:20-28. [Ermolina O.V., Antonov S.I., Korotkova O.V. Change of soybean seed quality during breeding in the Don region. Zernovoe Khozjaistvo Rossii = Grain Economy of Russia. 2011;6:20-28. (in Russian)]  
 Зеленцов С.В., Мошненко Е.В. Пути адаптации сельского хозяйства России к глобальным изменениям климата на примере экологической селекции сои. Науч. диалог. 2012;7:40-59. [Zelentsov S.V., Moshnenko E.V. Ways of adaptation of Russian agriculture to global climatic changes by the example of soybean ecological breeding. Nauchnyi Dialog = Scientific Dialogue. 2012; 7:40-59. (in Russian)]  
 Зеленцов С.В., Мошненко Е.В. Перспективы селекции высокобелковых сортов сои: моделирование механизмов увеличения белка в семенах (сообщение 1). Маслич. культуры. Науч.-техн. бюл. Всерос. НИИ масличных культур. 2016;2(166):34-41. [Zelentsov S.V., Moshnenko E.V. Prospects of the breeding of high-protein soybean varieties: modeling of mechanisms increasing protein content in seeds: Report 1. Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskij Byulleten VNIIMK = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops. 2016;2(166):34-41. (in Russian)]  
 Корсаков Н.И., Адамова О.П., Буданова В.И. Методические указания по изучению коллекции зерновых бобовых культур. Л.: ВИР, 1975. [Korsakov N.I., Adamova O.P., Budanova V.I. Methodical Guidelines on the Study of the Collection of Grain Legumes. Leningrad: VIR Publ., 1975. (in Russian)]  
 Кочегура А.В., Зеленцов С.В., Мошненко Е.В., Петибская В.С. Селекционно-генетическое улучшение сои по биохимическим признакам. Маслич. культуры. Науч.-техн. бюл. Всерос. НИИ масличных культур. 2005;2(133):24-35. [Kochegura A.V., Zelentsov S.V., Moshnenko E.V., Petibskaya V.S. Breeding and genetic improvement of biochemical parameters in soybean. Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskij Byulleten VNIIMK = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops. 2005;2(133):24-35. (in Russian)]  
 Лешенко А.К., Михайлов В.Г., Сичкарь В.И. Селекция, семеноведение и семеноводство сои. Киев: Урожай, 1985. [Leshchenko A.K., Mikhailov V.G., Sichkar V.I. Soybean Breeding, Seed Studies, and Seed Industry. Kiev: Urozhaj Publ., 1985. (in Russian)]  
 Мякушко Ю.П., Баранов В.Ф. Соя. М.: Колос, 1984. [Myakushko Yu.P., Baranov V.F. Soybean. Moscow: Kolos Publ., 1984. (in Russian)]  
 Петибская В.С. Соя: Химический состав и использование. Краснодар, 2012. [Petibskaya V.S. Soy: Chemical Composition and Use. Krasnodar, 2012. (in Russian)]

- Сеферова И.В., Новикова Л.Ю., Некрасов А.Ю. Оценка реакции сои сорта Комсомолка на изменения климата в Краснодарском крае. Маслич. культуры. Науч.-техн. бюл. Всерос. НИИ масличных культур. 2011;1(146-147):72-77. [Seferova I.V., Novikova L.Yu., Nekrasov A.Yu. Assessment of the response of soybean cv. Komsomolka to climate changes in the Krasnodar region. Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskii Byulleten VNIIMK = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops. 2011;1(146-147):72-77. (in Russian)]
- Сиротенко О.Д. Основы сельскохозяйственной метеорологии. Т. 2. Методы расчетов и прогнозов в агрометеорологии. Кн. 1. Математические модели в агрометеорологии. Обнинск, 2012. [Sirotenko O.D. Basis of Agricultural Meteorology. Vol. 2: Methods of Calculations and Forecasts in Agricultural Meteorology. Book 1: Mathematical Models in Agricultural Meteorology. Obninsk, 2012. (in Russian)]
- Степанова В.М. Климат и сорт. Соя. Л.: Гидрометеоздат, 1985. [Stepanova V.M. Climate and Variety: Soybean. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ., 1985. (in Russian)]
- Щелко Л., Седова Т., Корнейчук В., Пастуха Л., Синский Т., Гофирек П., Бареш И., Сегналова Я. Международный классификатор СЭВ рода *Glycine* Willd. Л., 1990. [Shchelko L., Sedova T., Kornejchuk V., Pastukha L., Sinskiy T., Gofirek P., Baresh I., Segnalova I. The International Comecon List of Descriptors for the Genus *Glycine* Willd. Leningrad, 1990. (in Russian)]
- Andresen J.A., Alagarswamy G., Rotz C.A., Ritchie J.T., LeBaron A.W. Weather impacts on maize, soybean, and alfalfa production in the great lakes region. 1895–1996. *Agron. J.* 2001;93:1059-1070. DOI 10.2134/agronj2001.9351059x.
- Bellaloui N., Bruns H.A., Abbas H.K., Mengistu A., Fisher D.K., Reddy K.N. Agricultural practices altered soybean seed protein, oil, fatty acids, sugars, and minerals in the Midsouth USA. *Front. Plant Sci.* 2015;6:31. DOI 10.3389/fpls.2015.00031.
- Dardanelli J.L., Balzarini M., Martinez M.J., Cuniberti M., Resnik S., Ramunda S.F., Herrero R., Baigorri H. Soybean maturity groups, environments, and their interaction define mega-environments for seed composition in Argentina. *Crop Sci.* 2006;46(5):1939-1947. DOI 10.2135/cropsci2005.12-0480.
- Dornbos D.L., Mullen R.E. Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1992;69:228-231. DOI 10.1007/BF02635891.
- Gibson L.R., Mullen R.E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996;73:733-737. DOI 10.1007/BF02517949.
- Iler A.M., Inouye D.W., Schmidt N.M., Høye T.T. Detrending phenological time series improves climate-phenology analyses and reveals evidence of plasticity. *Ecology.* 2017;98(3):647-655. DOI 10.1002/ecy.1690.
- Kaukoranta T., Hakala K. Impact of spring warming on sowing times of cereal, potato and sugar beet in Finland. *Agric. Food Sci.* 2008; 17:165-176. DOI 10.2137/145960608785328198.
- Ojo D.K., Adebisi M.A., Tijani B.O. Influence of environment on protein and oil contents of soybeans seed (*Glycine max* (L.) Merrill). *Global J. Agric. Sci.* 2002;1(1):27-32. DOI 10.4314/gjass.v1i1.2199.
- Piper E., Boote K.I. Temperature and cultivar effects on soybean seed oil and protein concentrations. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999;76(10): 1233-1241. DOI 10.1007/s11746-999-0099-y.
- Sato K., Ikeda T. The growth responses of soybean to photoperiod and temperature. IV. The effect of temperature during the ripening period on the yield and characters of seeds. *Jpn J. Crop. Sci.* 1979;48:283-290. DOI 10.1626/jcs.48.283.
- Song W., Yang R., Wu T., Wu C., Sun S., Zhang S., Jiang B., Tian S., Liu X., Han T. Analyzing the effects of climate factors on soybean protein, oil contents, and composition by extensive and high-density sampling in China. *J. Agric. Food Chem.* 2016;64(20):4121-4130. DOI 10.1021/acs.jafc.6b00008.
- Sudaric A., Simic D., Vratarić M. Characterization of genotype by environment interactions in soybean breeding programmes of Southeast Europe. *Plant Breed.* 2006;125:191-194. DOI 10.1111/j.1439-0523.2006.01185.x.
- USDA (United States Department of Agriculture). Agricultural Research Service. <https://www.ars-grin.gov/npgs/index.html>. Available 08.02.2018.
- Usual Planting and Harvesting Dates for U.S. field crops. Agricultural Statistics Board December. National Agricultural Statistic Service, USDA. 1997. *Agricultural Handbook*.
- Wolf R.B., Cavins J.F., Kleiman R., Black L.T. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids, and sugars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1982;59:230-232. DOI 10.1007/BF02582182.
- Yaklich E.W., Vinyard B., Camp M., Douglass S. Analysis of seed protein and oil from soybean Northern and Southern Region Uniform Tests. *Crop. Sci.* 2002;42:1504-1515. DOI 10.2135/cropsci2002.1504.

#### ORCID ID

L.Yu. Novikova [orcid.org/0000-0003-4051-3671](https://orcid.org/0000-0003-4051-3671)  
I.V. Seferova [orcid.org/0000-0003-3308-9198](https://orcid.org/0000-0003-3308-9198)  
A.Yu. Nekrasov [orcid.org/0000-0001-7332-1209](https://orcid.org/0000-0001-7332-1209)  
I.N. Perchuk [orcid.org/0000-0001-6568-5248](https://orcid.org/0000-0001-6568-5248)  
T.V. Shelenga [orcid.org/0000-0003-3992-5353](https://orcid.org/0000-0003-3992-5353)  
M.G. Samsonova [orcid.org/0000-0001-8170-1260](https://orcid.org/0000-0001-8170-1260)  
M.A. Vishnyakova [orcid.org/0000-0003-2808-7745](https://orcid.org/0000-0003-2808-7745)

# Современные представления о генетике агрессивного поведения

Ю.Д. Давыдова<sup>1</sup>, С.С. Литвинов<sup>1</sup>, Р.Ф. Еникеева<sup>1</sup>, С.Б. Малых<sup>2</sup>, Э.К. Хуснутдинова<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

<sup>3</sup> Кафедра генетики и фундаментальной медицины, Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Понимание механизмов нормального и патологического поведения человека представляет собой одну из актуальных проблем современной нейробиологии и медицины. Агрессивное поведение является неотъемлемой частью человеческой психики, однако стрессовые воздействия окружающей среды, предрасполагающие психические расстройства и перенесенные соматические заболевания могут служить причиной развития повышенной агрессивности, которая, в свою очередь, рассматривается как биологическая основа антисоциального поведения в человеческом обществе. Немаловажное значение в развитии агрессивного поведения принадлежит наследственным факторам, среди которых ключевая роль отводится нарушениям нейромедиаторного обмена в головном мозге, однако генетические механизмы, лежащие в его основе, до сих пор не ясны. Это обусловлено большим количеством однонуклеотидных замен, инсерций и делеций в структуре генов, кодирующих компоненты нейромедиаторных систем, каждый из которых привносит лишь небольшой вклад (1–2 %) в формирование признака. Среди ключевых генов-кандидатов развития агрессивного поведения традиционно рассматриваются гены серотонинергической (*TPH1*, *TPH2*, *HTR2A*, *SLC6A4*) и дофаминергической (*DRD4*, *SLC6A3*) систем, а также гены ферментов их метаболизма (*COMT*, *MAOA*). Кроме того, имеются данные об участии генов гипоталамо-гипофизарной системы (*OXT*, *OXTR*, *AVPR1A*, *AVPR1B*) и рецепторов половых гормонов (*ER1*, *AR*), генов семейства нейротрофинов (*BDNF*) и нейронального апоптоза (*CASP3*, *BAX*) в развитии агрессивности. Результаты полногеномных анализов ассоциаций (GWAS) позволяют говорить о вовлеченности в развитие агрессивного поведения генов нерецепторной тирозинкиназы *FYN*, трансмембранного белка нервной системы *LRRTM4*, нейротримина *NTM*, кадгерина *CDH13*, участвующего в клеточной адгезии, и фермента *DYRK1A*, участие которого отмечено в пролиферации клеток и синаптической пластичности. Эти и другие литературные данные дают возможность предположить, что формирование генетической предрасположенности к агрессивному поведению – весьма сложный процесс, затрагивающий функционирование большого числа генов. Кроме того, ни один из наиболее изученных генов-кандидатов не объясняет значительной вариабельности по данному признаку, по причине чего в этой области до сих пор существует ряд открытых вопросов.

Ключевые слова: агрессия; агрессивное поведение; генетика поведения; нейромедиаторные системы; полиморфные варианты.

## Recent advances in genetics of aggressive behavior

J.D. Davydova<sup>1</sup>, S.S. Litvinov<sup>1</sup>, R.F. Enikeeva<sup>1</sup>, S.B. Malykh<sup>2</sup>, E.K. Khusnutdinova<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Psychological Institute, Russian Academy of Education, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Department of Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State University, Ufa, Russia

One of the most important problems of modern neurobiology and medicine is an understanding of the mechanisms of normal and pathological behavior of a person. Aggressive behavior is an integral part of the human psyche. However, environmental risk factors, mental illness and somatic diseases can lead to increased aggression to be the biological basis of anti-social behavior in a human society. An important role in development of aggressive behavior belongs to the hereditary factors that may be linked to abnormal functioning of neurotransmitter systems in the brain yet the underlying genetic mechanisms remain unclear, which is due to a large number of single nucleotide polymorphisms, insertions and deletions in the structure of genes that encode the components of the neurotransmitter systems. The most studied candidate genes for aggressive behavior are serotonergic (*TPH1*, *TPH2*, *HTR2A*, *SLC6A4*) and dopaminergic (*DRD4*, *SLC6A3*) system genes, as well as the serotonin or catecholamine metabolizing enzyme genes (*COMT*, *MAOA*). In addition, there is evidence that the hypothalamic-pituitary system genes (*OXT*, *OXTR*, *AVPR1A*, *AVPR1B*), the sex hormone receptors genes (*ER1*, *AR*), neurotrophin (*BDNF*) and neuronal apoptosis genes (*CASP3*, *BAX*) may also be involved in development of aggressive behavior. The results of Genome-Wide Association Studies (GWAS) have demonstrated that *FYN*, *LRRTM4*, *NTM*, *CDH13*, *DYRK1A* and other genes are involved in regulation of aggressive behavior. These and other evidence suggest that genetic predisposition to aggressive behavior may be a very complex process.

Key words: aggression; aggressive behavior; behavior genetics; neurotransmitter systems; polymorphisms.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Давыдова Ю.Д., Литвинов С.С., Еникеева Р.Ф., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. Современные представления о генетике агрессивного поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):716-725. DOI 10.18699/VJ18.415

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Davydova J.D., Litvinov S.S., Enikeeva R.F., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Recent advances in genetics of aggressive behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):716-725. DOI 10.18699/VJ18.415

Согласно современным данным, нестабильные социально-экономические, биологические и экологические факторы динамично развивающегося общества оказывают значительное влияние на психологический статус индивидов и могут послужить предпосылками к развитию психопатологий различного характера. Агрессивное поведение (АП) – это сложный признак, который является показателем переживания стресса и подразумевает действия, нацеленные на причинение морального, физического и иного ущерба другому существу или объекту, а также самому себе (аутоагрессия или суицидальное поведение). В разумных пределах агрессия является важным компонентом социальной жизни человека, поскольку необходима для достижения поставленных целей, поддержания и повышения социального статуса индивида и преодоления межличностных конфликтов (Бэрон, Ричардсон, 2001). Однако аномальная или повышенная агрессия нередко становится причиной совершения преступлений различной степени тяжести. Данные МВД РФ указывают, что за 2017 г. в России было совершено около 2 млн преступлений, из которых на долю убийств и умышленного причинения тяжкого вреда здоровью приходится 9.7 и 24.6 тыс. случаев соответственно (Росстат, 2017). Подобная картина наблюдается в большинстве регионов, за исключением стран Южной и Центральной Америки, а также стран Южной Африки, в которых показатели преступности выше в два-три раза (UNODC, 2017). Таким образом, повышенная агрессивность – одна из наиболее важных социальных проблем в человеческом обществе.

### **Феноменология агрессивного поведения**

В настоящий момент любые формы АП в больших или малых размерах (буллинг, преступное поведение, терроризм и др.) представляют собой сложнейший многоаспектный феномен, знания о котором полны различных интерпретаций и классификаций. Большинство из них сходятся во мнении, что АП – это действие, направленное на причинение вреда или ущерба другому живому существу, не желающему подобного обращения (Бэрон, Ричардсон, 2001). Исходя из этого, АП может быть импульсивным или хорошо спланированным, направленным на причинение вреда жертве, или служить для достижения определенных целей, а также может рассматриваться как ответ на чужие негативные действия или как реакция по их предупреждению (Ткаченко, 2016). Различны и способы проявления агрессии, что может быть представлено в виде дихотомических классификаций, таких как физическая и вербальная, активная и реактивная, прямая или косвенная формы агрессии. Нередко агрессия ассоциируется с широким кругом негативных эмоций (злостью или ненавистью), мотивов (стремлением оскорбить или навредить) и негативных установок (расовыми или этническими предрассудками). Но несмотря на то, что все эти факторы, безусловно, играют важную роль в АП, их наличие не является необходимым условием для подобных действий (Бэрон, Ричардсон, 2001).

Следует отметить, что АП может проявляться у всех людей, как психически здоровых, так и имеющих психические расстройства. Очевидно, что в последнем случае влияние на формирование АП и реализацию агрессии

может оказывать целый ряд факторов, главным образом наличие конкретного психопатологического синдрома (Дмитриева, Шостакович, 2002). Среди таковых исследователи отмечают сумеречное расстройство сознания, биполярное расстройство, алкогольную зависимость, галлюцинаторно-бредовые, бредовые или аффективные психопатии и шизофрению (Дмитриева, Шостакович, 2002; Blanco et al., 2018; Waleewong et al., 2018). Причем отмечено, что риск совершения насильственных действий среди больных шизофренией является наиболее значительным по причине систематизированного бреда с высокой динамикой развития, исключающего внутренние нормы и контроль (Дмитриева, Шостакович, 2002; Blanco et al., 2018). Известно, что АП может также предшествовать депрессивная реакция, протекающая по механизму «короткого замыкания», или влечение к самоубийству по мотивам самообвинения и искупления вины (Дмитриева, Шостакович, 2002).

Что касается здоровых индивидов, то необходимо упомянуть о чертах, которые дают возможность говорить о предрасположенности к совершению агрессивных поступков. К ним, прежде всего, относятся: тревожность и страх социального неодобрения, предвзятая атрибуция враждебности, излишняя раздражительность и эмоциональная чувствительность (Бэрон, Ричардсон, 2001). Кроме того, причиной АП может послужить негативный характер детско-родительских взаимоотношений в период воспитания (King et al., 2018). Интересны также данные, сообщающие об эволюционной обусловленности различий в уровне агрессии у мужчин и у женщин, в связи с чем предпринимались исследования влияния гормонального статуса на АП (Бэрон, Ричардсон, 2001; Georgiev et al., 2013).

Несмотря на значительный прогресс в изучении АП, в связи с широким кругом определений, теорий и факторов до сих пор не выявлена целостная картина в описании механизмов развития, индивидуальных и половозрастных особенностей агрессии. Хотя и существуют заслуживающие внимания свидетельства о связи между индивидуальными и социально-демографическими факторами, психопатологическими состояниями и риском АП, их причинно-следственная направленность все еще требует дополнительных исследований.

### **Методы и подходы к изучению агрессивного поведения**

#### **Психологическая оценка агрессивного поведения**

В настоящее время существуют определенные наборы методов, направленных на выявление характера агрессивных проявлений у человека. Первостепенное значение в них отводится экспериментальному подходу, позволяющему опосредованно судить об уровне агрессии по независимым переменным. Для этих целей было разработано множество опросников, посвященных изучению общей агрессивности, АП в конкретных ситуациях или же отдельным фенотипам агрессии, таким как гнев или враждебность.

Наиболее известными опросниками являются: методика диагностики показателей и форм агрессии Басса–Дарки (BDHI), опросник агрессии Басса–Перри (BPAQ), шкала

ориентации гнева Ч.Д. Спилбергера, методика оценки агрессивности в отношениях А. Ассингера, методика личностной агрессивности и конфликтности Е.П. Ильина и П.А. Ковалева и т. д. К проективным методикам, которые также используют при изучении агрессии, относятся тест тематической апперцепции (ТАТ) и тест чернильных пятен Роршаха (Гурская, 2008).

### Нейрофизиологические исследования агрессивного поведения

В рамках нейрофизиологического подхода важную роль в детерминации АП играет взаимодействие специализированных структур головного мозга, призванных обеспечить адекватный ответ организма на изменения внешней или внутренней среды. В этом случае используются такие методы, как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), функциональная магнитно-резонансная томография (ФМРТ), электроэнцефалография (ЭЭГ), метод вызванных потенциалов (ВП) и др. С помощью этих методов показано, что для индивидов с высоким уровнем АП характерны уменьшение объема миндалевидного комплекса (Pardini et al., 2014) и серого вещества в орбитофронтальной коре (Gansler et al., 2009), отклонения в паттерне и когерентности ЭЭГ (Рагозинская, 2015), а также снижение амплитуды компонента P300 ВП, типичное, в том числе, и для больных шизофренией (Гусев и др., 2009).

### Изучение наследственных факторов в регуляции агрессивного поведения

К настоящему времени проведено множество близнецовых исследований, предполагающих сравнение монозиготных близнецов, воспитывающихся в разных условиях постэмбрионального периода, которые доказывают роль наследственности в развитии АП. Установлено, что коэффициент наследуемости агрессивности составляет около 50 %: от 30 до 81 % для отдельных фенотипов агрессивности, в том числе и для антисоциального поведения (Viding et al., 2005; Tuvblad et al., 2011). Подобный разброс в значениях объясняется неоднородностью исследуемых групп, а также широким кругом средовых факторов, которые учитываются в конкретных исследованиях. Однако близнецовый метод позволяет произвести оценку наследуемости лишь в целом, без выявления конкретных маркеров, лежащих в основе развития данного признака.

Одной из наиболее ранних гипотез, призванной объяснить наследственную природу АП, является предположение о влиянии аномалий числа половых хромосом на уровень агрессии. Эта гипотеза была отражена в работе Мейера-Бальбурга, который отметил, что наличие избыточной Y-хромосомы ведет к увеличению уровня агрессии (например, 47XYY-синдром, который чаще встречается среди лиц, находящихся в тюремном заключении), а избыточной X-хромосомы (например, 47XXX у женщин) – к его уменьшению (Meyer-Bahlburg, 1981; цит. по: Бэрон, Ричардсон, 2001), однако далеко не все исследования подтвердили эту гипотезу. Существуют данные, указывающие и на повышенную агрессию у мужчин с кариотипом 47XXY (синдром Клайнфельтера) (Stochholm et al., 2012). Кроме того, связь многих хромосомных аномалий с АП

может быть объяснена низким уровнем интеллекта или высоким уровнем импульсивности у индивидов, что и послужило, предположительно, причиной совершения преступлений (Бэрон, Ричардсон, 2001).

В последние десятилетия при изучении предрасположенности к АП все большее значение приобретают молекулярно-генетические исследования, ключевыми из которых являются поиск генов-кандидатов на основании их функциональной значимости, предполагающий исследование ассоциации признака с аллелями генов, вовлеченных в функционирование различных систем, а также полногеномный анализ ассоциаций (GWAS), в ходе которого исследуются сотни тысяч однонуклеотидных полиморфных локусов (SNP), покрывающих геном. Но несмотря на результаты многочисленных исследований, генетическая природа этой характеристики до сих пор остается малоизученной. Существует ряд теорий развития АП, главная роль в которых отводится нарушениям нейромедиаторного обмена в головном мозге, связанным с большим количеством однонуклеотидных замен, инсерций и делеций в структуре генов, кодирующих компоненты различных медиаторных систем. Однако точная идентификация генов, вовлеченных в регуляцию АП, затруднена, поскольку каждый из них привносит лишь небольшой вклад (1–2 %) в формирование признака (Казанцева, Хуснутдинова, 2017).

### Молекулярно-генетические маркеры предрасположенности к агрессивному поведению

#### Гены нейромедиаторных систем

На сегодняшний день в значительной степени изучена генетическая роль серотонинергической и дофаминергической систем в развитии АП человека. Установлено, что повышение активности серотонинергической системы ведет к снижению уровня агрессии, в то время как активация катехоламинергических систем, наоборот, ее стимулирует (Miczek et al., 2007). Таким образом, гены, кодирующие белки, которые участвуют в метаболизме серотонина и дофамина, являются кандидатами для агрессивного поведения.

Ключевой фермент биосинтеза серотонина – триптофангидроксилаза (tph), которая на первом лимитирующем этапе катализирует гидроксилирование триптофана до 5'-гидрокситриптофана с последующим декарбоксилированием до серотонина. Для данного фермента характерно наличие двух изоформ: tph-1 и tph-2, кодируемых генами *TPH1* (11p15.1) и *TPH2* (12q21.1) соответственно. Одним из наиболее изученных полиморфных сайтов в гене *TPH1* является однонуклеотидная замена *218A > C* (*rs1800532*) в интроне 7, ведущая к снижению уровня экспрессии гена, поскольку локализована в сайте связывания с транскрипционным фактором GATA. В ряде исследований показана связь «высокоактивного» аллеля \*A и/или генотипа \*A/\*A с аутоагрессией (Beden et al., 2016), а также генотипа \*C/\*C с высокими показателями по шкалам общей и вербальной агрессии у лиц с депрессивным расстройством (Koh et al., 2012). В гене *TPH2* широко исследуемым полиморфным вариантом является

замена  $-703G > T$  (*rs4570625*), которая определяет снижение транскрипционной активности гена. Результаты ассоциативных исследований аллелей локуса  $-703G > T$  в отношении агрессивности достаточно противоречивы, поскольку имеются данные, как указывающие на отсутствие ассоциаций аллеля  $*T$  с АП (Yoon et al., 2012), так и сообщающие об обратном (Laas et al., 2017). Подобные несоответствия, по мнению многих исследователей, могут быть обусловлены различиями в используемых выборках, связанными с размером выборки, этногеографическими и социально-экономическими факторами, а также с психологическим статусом и половой принадлежностью индивидов (Казанцева, Хуснутдинова, 2017).

Исследования полиморфных вариантов гена серотонинового транспортера *SLC6A4* (*5-HTT* или *SERT*; 17q11.2), который служит основным регулятором серотонинергической нейротрансмиссии в различных регионах мозга, позволили обнаружить варибельный участок длиной 44 п. н. в промоторе гена (*5-HTTLPR*), связанный с присутствием ( $*L$ ) или отсутствием ( $*S$ ) данного фрагмента. Кроме того, в инсерционной форме *5-HTTLPR\*L*, оказывающей стимулирующее воздействие на транскрипционную активность гена *SLC6A4*, отмечено существование еще одной замены  $-rs25531$  ( $A > G$ ), по причине чего некоторые исследователи рассматривают их как единый трехаллельный локус ( $*L_A$ ,  $*L_G$ ,  $*S$ ) (Wendland et al., 2006).

При изучении генетики аутоагрессии и насильственного поведения у мужчин-заклоченных было установлено, что носители генотипов  $*L_A/*L_A$ ,  $*L_A/*L_G$ ,  $*S/*L_A$ , демонстрирующих высокий и промежуточные варианты активности гена *SLC6A4*, в большей степени склонны к аутоагрессии, по сравнению с носителями «низкоактивных» генотипов  $*L_G/*L_G$ ,  $*S/*L_G$ ,  $*S/*S$  (Gorodetsky et al., 2016). В то же время в ряде других работ для аллеля  $*S$  и/или генотипа  $*S/*S$  была показана достоверная ассоциация с АП, склонностью к насилию и аутоагрессии как у детей (Cicchetti et al., 2012), так и у взрослых индивидов (Lopez-Castroman et al., 2014). Это может быть обусловлено тем, что для коротких аллелей характерны так называемые кумулятивные отрицательные эффекты, по причине чего носители  $*S$ -аллелей в большей степени восприимчивы к воздействию негативных факторов среды (van Ijzendoorn et al., 2012).

Другим вариантом гена *SLC6A4*, который может быть ассоциирован с АП, является VNTR-полиморфизм *STin2* (17 п. н.) во 2 интроне гена. Отмечено, что наличие двенадцати повторов (*Stin2\*12*), по сравнению с девятью и десятью, приводит к повышению транскрипционной активности гена (MacKenzie, Quinn, 1999), которая, по мнению многих исследователей, в совокупности с аллелем *5-HTTLPR\*S* связана с повышенной агрессивностью (Hemmings et al., 2018).

В дофаминергической системе ген рецептора *DRD4* (11p15.5), наряду с геном дофаминового транспортера *SLC6A3* (или *DAT*; 5p15.33), является наиболее изучаемым геном-кандидатом при АП. В экзоне 3 гена *DRD4* находится варибельный регион, содержащий от двух до одиннадцати повторов размером в 48 п. н., причем наибольшая связывающая способность рецептора отмечена при четырех повторах, а при семи наблюдается

значительное снижение уровня экспрессии (VanNess et al., 2005). В ходе исследований агрессивного и антисоциального поведения установлено, что  $*7R$ -повторы чаще встречаются у лиц, осужденных за тяжкие преступления (Черепкова и др., 2016), в особенности столкнувшихся со стрессовыми факторами в детстве (Schlomer et al., 2015). В то же время на российской выборке заключенных показано, что носители аллеля  $*5R$  также демонстрируют высокий уровень агрессии, схожий с таковым у носителей аллеля  $*7R$  (Cherepkova et al., 2015), что согласуется с данными об аналогичных функциональных изменениях рецептора *DRD4* при наличии как пяти, так и семи повторов (Takeuchi et al., 2015).

В гене *SLC6A3* обнаружен тандемный повтор *VNTR40* (от 3 до 11 раз), однако вопрос о связи количества повторов с экспрессионной активностью гена до сих пор остается открытым. В многочисленных работах показана ассоциация как аллеля  $*10R$  с антисоциальным поведением (Черепкова и др., 2016), так и аллеля  $*9R$  (Qadeer et al., 2017), причем ранее ассоциация аллеля  $*9R$  с повышенным уровнем агрессивности была подтверждена в лонгитудном исследовании на близнецах (Young et al., 2002).

Недавние исследования подтверждают роль моноаминоксидазы-А (ген *MAOA*; Xp11.3) – фермента, катализирующего окислительное дезаминирование серотонина, дофамина и норадреналина, в регуляции АП. На сегодняшний день в гене *MAOA* человека выявлено несколько полиморфных вариантов, в том числе *VNTR30*, для которого описано шесть вариантов повторов, наименее функциональным из которых является аллель  $*3R$  (или  $*L$ ), снижающий транскрипцию в пять раз по сравнению с  $*4R$  ( $*H$ ). Большинство исследователей сообщает об ассоциации аллеля  $*L$  с импульсивностью и АП (Schlüter et al., 2016; Zhang et al., 2016), в том числе по причине жестокого обращения в детстве (Holz et al., 2016).

Еще одним ферментом, участвующим в деградации катехоламинов, является катехол-О-метилтрансфераза (*COMT*; 22q11.21), в кодирующей части гена которой обнаружен функциональный локус *Val158Met*, снижающий активность фермента на 40 %. Существуют данные, указывающие на ассоциацию аллеля  $*Met$  с повышенным уровнем агрессии у индивидов в возрасте до 18 лет (Albaugh et al., 2010), а в одном из метаисследований было высказано предположение, что данная замена приблизительно на 50 % увеличивает риск АП у мужчин, больных шизофренией (Singh et al., 2012). Кроме того, в работе (Hygen et al., 2015) показано значительное влияние аллеля  $*Met$  на уровень агрессивности у детей, воспитывающихся в неблагоприятных условиях, однако у носителей данного аллеля из благополучных семей уровень агрессивности был ниже, чем у носителей аллеля  $*Val$ .

Роль ГАМК как основного нейромедиатора, участвующего в торможении центральной нервной системы (ЦНС), в развитии АП изначально была доказана на модельных объектах, поскольку мыши с низким уровнем ГАМК и повышенной концентрацией ГАМК-деградирующего фермента АВАТ демонстрировали значительно более высокие показатели агрессии (Jager et al., 2017). У человека влияние на АП было отмечено со стороны полиморфных вариантов гена *GABRA2* (4p12), кодирующего

$\alpha_2$ -субъединицу GABA<sub>A</sub>-рецептора: повышенная агрессия наблюдалась у носителей аллелей *rs279826\*A* и *rs279858\*A* (Kiive et al., 2017).

### Гены гипоталамо-гипофизарной системы

Другое важнейшее звено, участвующее в регуляции психических функций, – это гипоталамо-гипофизарная система, ключевая роль в которой принадлежит окситоцину, выполняющему функции, связанные с родами и лактацией, и вазопрессину, оказывающему антидиуретическое и вазопрессорное влияние, для которых помимо классического спектра действий известны и «неклассические» эффекты. Например, установлено, что концентрационный баланс между окситоцином и вазопрессином определяет различные социальные и эмоциональные реакции, а его нарушение описано при депрессии, тревожности и аутизме (Тюзикив и др., 2015).

Эффект окситоцина (ген *OXT*; 20p13) прежде всего зависит от его взаимодействия с рецептором *OXTR* (3p25.3). Установлено, что пониженная экспрессия гена *OXT*, низкая концентрация окситоцина в спинномозговой жидкости, а также высокая связывающая способность рецептора *OXTR* приводят к повышению уровня агрессии как у грызунов, так и у человека (Lee et al., 2009; Calcagnoli et al., 2014), однако данные о связи полиморфных локусов в генах *OXT* и *OXTR* с АП не так однозначны. В одном из исследований агрессивных тенденций была выявлена ассоциация генотипов *OXT-rs6133010\*A/\*A* × *OXTR-rs2254298\*G/\*G* × *OXTR-rs53576\*A/\*G* с высоким уровнем физической агрессии (Yang et al., 2017), при этом в другой работе данная ассоциация не подтвердилась, но была отмечена роль генотипа *rs1042778\*T/\*T* в развитии антисоциального поведения у мужчин (Waller et al., 2016).

Некоторые авторы провели также анализ полиморфных вариантов генов *OXTR* у детей с АП. В работе (Hovey et al., 2016) обнаружена ассоциация генотипов *rs4564970\*C/\*C*, *rs53576\*G/\*A*, *rs7632287\*A/\*A* с АП у мальчиков, тогда как генотип *rs2254298\*G/\*G* был ассоциирован с агрессией у девочек. В другом исследовании частоты аллелей *rs237898\*A*, *rs237902\*C* были выше в группе мальчиков с АП, а *rs6770632\*T* – в группе девочек (Malik et al., 2014).

Многочисленные данные указывают на то, что повышенная экспрессия гена вазопрессинового рецептора *AVPR1A* (12q14.2) в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса часто сопутствует тревожности и АП у грызунов (Gutzler et al., 2010). Дополнительное доказательство роли *AVPR1A* в регуляции агрессии было получено при исследовании генов-кандидатов (Parra et al., 2015), а также в одном из последних мета-анализов (van Donkelaar et al., 2018). Функциональные исследования на модельных объектах свидетельствуют и о важной роли гена *AVPR1B* в развитии АП. В частности, мыши с нокаутом по гену *AVPR1B* (1q32) в экспериментах демонстрировали значительное снижение уровня агрессии (Wersinger et al., 2002), а ассоциативные исследования в популяциях человека свидетельствуют о вовлеченности полиморфных локусов *rs35369693* и *rs28676508* в регуляцию агрессии у детей (Zai et al., 2012).

### Гены системы нейротрофического фактора

Кроме классических путей нейромедиаторной передачи, в настоящее время представляются интересными исследования генетики ферментов и рецепторов, вовлеченных в регуляцию нейротоксического и нейропротекторного ответов на стресс. Нейротрофические факторы (нейротрофины) – большая группа полипептидов, играющих ключевую роль в развитии и сохранении структур ЦНС (Porova et al., 2017), среди которых в мозге наиболее распространен фактор BDNF, кодируемый одноименным геном *BDNF* (11p14.1).

При анализе структуры гена *BDNF* у человека был выявлен функциональный локус *Val66Met* (*196G > A*; *rs6265*), который приводит к снижению секреции белка нейротрофина (Hong et al., 2011). В некоторых работах показано, что носители генотипа *\*Met/\*Met* характеризуются высоким уровнем агрессии (Kretschmer et al., 2014), в то время как другие исследователи такой взаимосвязи не выявили (Guan et al., 2014; Nagata et al., 2014). Кроме того, было отмечено, что модулирующий эффект генотипа *\*Met/\*Met* во многом определяется взаимодействием с такими средовыми факторами, как хронический стресс, негативный стиль родительского воспитания, жестокое обращение или сексуальное насилие в детстве, которые, в свою очередь, способствуют формированию агрессивного фенотипа (Wagner et al., 2010; Kretschmer et al., 2014; Avinun et al., 2018).

### Роль генов половых гормонов и их рецепторов

Как отмечалось ранее, существуют убедительные доказательства эволюционной гендер-специфичности агрессии, о чем может свидетельствовать мировая статистика преступности, в которой подавляющее число антисоциальных действий совершается лицами мужского пола (Бэррон, Ричардсон, 2001; Georgiev et al., 2013). В связи с этим изучение эффектов половых гормонов, оказываемых на психическое здоровье человека, приобретает все большую популярность в области психоэндокринологии.

Эстрогены – общая группа женских половых гормонов, активность которых в мозге обусловлена их взаимодействием с эстрогеновыми рецепторами ER $\alpha$  и ER $\beta$ , кодируемыми генами *ESR1* (6q25.1) и *ESR2* (14q23.3) соответственно. У человека в гене *ESR1* одним из функциональных локусов является повтор [TA]<sub>n</sub>, находящийся в неравновесии с локусами  $-397T > C$  (*rs2234693* или *PvuII*, по названию которого встречается альтернативное обозначение аллелей – *\*P* и *\*p*) и  $-351A > G$  (*rs9340799*; *XbaI* – аллели *\*X* и *\*x*). В немногочисленных исследованиях отмечена взаимосвязь между числом повторов [TA]<sub>n</sub> и уровнем физической агрессии у мужчин (Vaillancourt et al., 2012), а также аллелей *rs2234693\*P* и *rs9340799\*X* и гневом у девочек (Vermeersch et al., 2013).

Андрогены – мужские половые гормоны, тоже потенциально участвующие в регуляции активности ЦНС. Установлено, что протяженные полиглутаминовые участки ([CAG]<sub>n</sub>) в гене андрогенового рецептора *AR* (Xq12) снижают его функциональную активность. Кроме того, наблюдается значимая отрицательная связь между числом повторов и уровнем агрессии у мужчин (Butovskaya et al., 2015), что было также подтверждено при участии лиц,

осужденных за тяжкие преступления и изнасилования. Например, среднее число  $[CAG]_n$ -повторов у убийц и насильников составило 17.59 и 18.44 повтора соответственно, а в контрольной группе – 21.19 (Rajender et al., 2008).

### Гены нейронального апоптоза

Изучение нейрогенеза как важнейшего явления, лежащего в основе поддержания клеточного гомеостаза в нервной системе, приобретает сегодня все большую актуальность в связи с ростом психических расстройств в обществе. На сегодняшний день известно, что нарушения нейронального апоптоза выявляются при старении и различных нейропатологиях, сопровождающихся изменениями психологического статуса индивида. В том числе имеются немногочисленные исследования на модельных объектах, указывающих на связь процессов нейронального апоптоза с АП, которые могут послужить основой для проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований у человека (Брагин и др., 2017).

Например, у крыс с высоким уровнем агрессии обнаружена повышенная экспрессия гена каспазы *CASP3* в гипоталамусе и уровня мРНК антиапоптотического гена *BCL-XL* в ядрах шва, а также пониженная экспрессия проапоптотического гена *BAX* в гиппокампе (Ильчибаева и др., 2016). В другом исследовании было отмечено, что у крыс с АП повышена экспрессия генов семейства индуцируемого гипоксией фактора 3 *EGLN3*, протеогликанового хондроитинсульфата *ACAN*, тирозингидроксилазы *TH* и нейропептида *NTS*, а также понижена экспрессия транскрипционных факторов *MEF2C* и *SOX2*, тирозинкиназного рецептора *ERBB3*, актин-связывающего белка цитоскелета *EZR* и вазоактивного кишечного пептида *VIP* в вентральной тегментальной области среднего мозга, а в периакведуктуме наблюдалась повышенная экспрессия генов белка *KIRREL3* и синтазы оксида азота *NOS1* (Брагин и др., 2017), причем участие *NOS1* в развитии АП было доказано ранее у человека (Rujescu et al., 2008).

### Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS)

На данном этапе развития психогенетики одним из наиболее перспективных методов изучения сложных поведенческих признаков является метод полногеномного анализа ассоциаций (GWAS), в котором анализу подвергаются сразу тысячи однонуклеотидных замен. Однако к настоящему времени проведено лишь небольшое число GWAS по изучению АП у человека.

В рамках консорциума EAGLE в 2015 г. научный коллектив провел полногеномный анализ ассоциаций АП у 18988 детей в двух возрастных группах: в дошкольном возрасте 3–7 лет и в младшем школьном/подростковом возрасте 8–15 лет. Была выявлена наиболее значимая ассоциация с полиморфным локусом *rs11126630* как в общей выборке ( $p = 5.30 \cdot 10^{-8}$ ), так и в выборках дошкольного ( $p = 1.27 \cdot 10^{-5}$ ) и младшего школьного/подросткового возраста ( $p = 6.32 \cdot 10^{-7}$ ), который, как сообщают авторы, находится в межгенном регионе *LRRTM4* и *SNAR-H* (Parra et al., 2015). Существуют данные, указывающие на то, что хромосомный регион 2p12, в котором локализованы гены *LRRTM4* и *SNAR-H*, связан с риском аутоагрессии (Willour et al., 2007). Это также подтверждено в GWAS-

анализе суицидального поведения, в котором ген *LRRTM4* был ассоциирован с риском суицидальных тенденций у женщин (*rs10170138*,  $p = 9.27 \cdot 10^{-7}$ ) (Willour et al., 2012), что дает основания говорить и о его участии в механизмах внешненаправленной агрессии.

Продукт гена *LRRTM4* относится к семейству молекул клеточной адгезии, экспрессируется в зубчатой извилине гиппокампа и участвует в регуляции развития возбуждательного синапса посредством взаимодействия с пресинаптическими гепарансульфат-протеогликанами (HSPG) (Siddiqui et al., 2013). Кроме полиморфного локуса *rs11126630*, вблизи этого гена обнаружены замены *rs10169036*, *rs1176317*, *rs12613157*, *rs1542677*, *rs1542678*, различия по которым достигли уровня значимости как в общей выборке ( $p < 1.02 \cdot 10^{-6}$ ), так и в выборке детей младшего школьного/подросткового возраста ( $p < 2.90 \cdot 10^{-6}$ ) (Parra et al., 2015). Что касается *SNAR-H*, данный ген относится к семейству малых РНК, ассоциированных с ядерным фактором NF90, участвует в регуляции транскрипции и экспрессируется в нейронах (Parrott, Mathews, 2007). Однако его роль в регуляции поведения еще не до конца ясна и требует проведения дополнительных исследований.

Известно, что у индивидов с синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) помимо невнимательности и повышенной импульсивности часто выявляются признаки враждебности и агрессии, вследствие чего эти характеристики нередко анализируются совместно. При исследовании АП у 1060 взрослых индивидов с СДВГ отмечена наиболее сильная ассоциация с локусом *rs10826548* (транскрипт *lncRNA*;  $p = 1.07 \cdot 10^{-6}$ ), а также с *rs35974940* в гене нейротримина *NTM* ( $p = 1.26 \cdot 10^{-6}$ ), участвующего в клеточной адгезии и процессах роста нейритов в нейронах (Brevik et al., 2016).

Кроме того, было выполнено несколько GWAS по отдельным фенотипам АП. В одном из таких исследований при участии 8747 человек в возрасте 45–64 лет был выявлен полиморфный локус *rs2148710* ( $p = 2.9 \cdot 10^{-8}$ ), ассоциированный с проявлениями гнева по шкале STAXI Ч.Д. Спилбергера. Установлено, что данный локус располагается в хромосомном регионе 6q21 в гене *FYN*, кодирующем нерецепторную тирозинкиназу, активность которой может быть связана с дисрегуляцией настроения. Поскольку постсинаптическое связывание нейротрофического фактора мозга BDNF с тирозинкиназным рецептором В активизирует нерецепторную тирозинкиназу, фосфорилирующую NDMA-рецепторы и инозитол-1,4,5-трифосфат-связанные каналы, то данные сигнальные пути, лежащие в основе регуляции внутриклеточного гомеостаза кальция (в частности, имеющего важное значение для функционирования ЦНС и выживания нейронов), могут быть вовлечены в формирование эмоциональных характеристик человека, в том числе черт гнева (Mick et al., 2014).

При изучении генетических основ антисоциального поведения с использованием полногеномного анализа у 543 финских преступников и 9616 индивидов из общей популяции наиболее сильные сигналы были выявлены в хромосомном регионе 6p21.2 для *rs4714329* ( $p = 1.6 \cdot 10^{-9}$ ) и *rs9471290* ( $p = 2.9 \cdot 10^{-7}$ ) вблизи генов *LINC00951* и *LRFN2*, экспрессия которых преимущественно наблю-

дается в мозжечке (Rautiainen et al., 2016). Кроме того, нарушения функционирования продукта гена *LRFN2*, участвующего в процессах клеточной адгезии, пластичности, а также в развитии возбуждательного синапса, традиционно связывают с рядом когнитивных нарушений (Bereczki et al., 2018).

Следует отметить, что GWAS-анализ, проведенный M.R. Rautiainen с коллегами, не является единичным исследованием насильственного и антисоциального поведения. Например, на той же выборке J. Tiitonen с коллегами установил значимую ассоциацию с полиморфным вариантом *rs11649622* ( $p = 4.19 \cdot 10^{-6}$ ), расположенным на длинном плече хромосомы 16 (q23.3) в интронной области гена кадгерина (*CDH13*), участвующего в клеточной адгезии, а дополнительный анализ полиморфных вариантов гена позволил выявить ассоциацию гаплотипов *\*A/\*A* (*rs11649622*, *rs7190768*;  $p = 6.2 \cdot 10^{-7}$ ) и *\*G/\*G/\*A/\*A* (*rs12919501*, *rs4075942*, *rs11649622* и *rs7190768*;  $p = 7.0 \cdot 10^{-6}$ ) с чрезвычайно жестоким поведением у преступников (Tiitonen et al., 2015).

Другим примером может служить исследование (Tielbeek et al., 2017), в котором результаты приведены с учетом половой принадлежности. Так, у женщин выявлена ассоциация с локусом *rs2764450* ( $p = 4.8 \cdot 10^{-8}$ ) на хромосоме 1 и *rs11215217* ( $p = 2.1 \cdot 10^{-8}$ ) на хромосоме 11. У мужчин при анализе ассоциаций с антисоциальным поведением наиболее сильный сигнал получен для *rs41456347* ( $p = 2.0 \cdot 10^{-8}$ ) на X хромосоме (Tielbeek et al., 2017). Ранее этот же автор указывал на ассоциацию с антисоциальным поведением локусов *rs12106331*, *rs2835702* и *rs2835771* ( $p = 8.7 \cdot 10^{-5}$ ) в гене *DYRK1A* (21q22.13), кодирующем фермент, который играет ключевую роль в сигнальном пути, пролиферации клеток и связан с синаптической пластичностью. Также *DYRK1A* является кандидатным геном для изучения риска развития умственной отсталости, поскольку локализован в критической хромосомной области для развития синдрома Дауна (Tielbeek et al., 2012).

## Заключение

Таким образом, агрессивное поведение представляет собой сложный, многофакторный признак, на развитие которого оказывают влияние как средовые, так и генетические факторы. Большинство проведенных исследований по изучению генетических основ АП ограничено ген-кандидатным подходом и анализом сцепления локусов генов, преимущественно вовлеченных в нейромедиаторный обмен. Кроме этого, существуют результаты ассоциативных исследований ряда генов, кодирующих ключевые нейротрансмиттеры и гормоны, а также вовлеченных в процессы синаптической пластичности и нейронального апоптоза, что свидетельствует о том, что формирование генетической предрасположенности к АП – весьма сложный процесс, затрагивающий нарушения в целом каскаде реакций и работе генов, каждый из которых привносит лишь небольшой вклад (1–2 % от общей вариативности) в развитие патологической агрессивности. Следует отметить, что не исключается и влияние генно-средовых взаимодействий, этногеографических и социокультурных факторов, а также половых особенностей на степень проявления агрессивного фенотипа, по причине чего учет данных характери-

стик в ходе будущих исследований, возможно, позволит устранить существующие противоречия и приблизиться к пониманию природы АП.

Несмотря на то что за последние десятилетия проведено достаточно много генетических исследований АП как в норме, так и при патологии, число полногеномных исследований все еще остается незначительным. Результаты GWAS, обобщенные в рамках данного обзора, имеют достаточно противоречивый характер, с трудом реплицируются в работах других авторов, однако сходятся в том, что ключевыми процессами, задействованными в формировании агрессивного фенотипа, являются процессы клеточной адгезии, синаптической пластичности и нейрогенеза, изменения в которых традиционно рассматривались в контексте основных причин для развития когнитивных нарушений и нейродегенеративных расстройств. Исходя из этого, гены, вовлеченные в данные процессы, могут рассматриваться в качестве потенциальных генетических маркеров для дальнейшего исследования основ АП, поскольку ранее они не изучались при ген-кандидатном подходе.

Предполагается, что значительный вклад в понимание механизмов развития АП могут внести комплексные исследования эпигенетических факторов, таких как метилирование и ацетилирование ДНК и гистонов, а также микроРНК, участвующих в регуляции экспрессии целевых генов. Кроме того, актуальным представляется построение и анализ генных сетей, описывающих взаимосвязи между молекулярно-генетическими маркерами, ассоциированными с агрессивностью, что позволит определить новые гены-кандидаты для дальнейших экспериментальных исследований механизмов АП.

## Благодарности

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

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы/References

- Брагин А.О., Сайк О.В., Чадаева И.В., Деменков П.С., Маркель А.Л., Орлов Ю.Л., Рогов Е.И., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Роль генов апоптоза в контроле агрессивного поведения, выявленная с помощью комбинированного анализа ассоциативных генных сетей, экспрессионных и геномных данных по серым крысам с агрессивным поведением. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):911-919. DOI 10.18699/VJ17.312. [Bragin A.O., Saik O.V., Chadaeva I.V., Demenkov P.S., Markel A.L., Orlov Yu.L., Rogov E.I., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Role of apoptosis genes in aggression revealed using combined analysis of ANDSystem gene networks, expression and genomic data in grey rats with aggressive behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017; 21(8):911-919. DOI 10.18699/VJ17.312. (in Russian)]
- Бэрн Р., Ричардсон Д. Агрессия. СПб.: Питер, 2001. [Baron R., Richardson D. (Eds.) Human Aggression. New York: Plenum Publ., 1994. Russ. ed.: Baron R., Richardson D. Aggression. St. Petersburg: Piter Publ., 2001. (in Russian)]
- Гурская И.Ю. Методологические проблемы исследования проявления агрессивного поведения. Учен. зап. Пед. ин-та СГУ им. Н.Г. Чернышевского. Сер. Психология. Педагогика. 2008;

- 1(3-4):13-17. [Gurskaya I.Y. Methodological problems in the research of aggressive behavior. *Uchenye Zapiski Pedagogicheskogo Instituta Saratovskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Ser. Psychologiya. Pedagogica = Scientific Reports of the Chernyshevskiy Pedagogical Institute, Saratov State University, Ser: Psychology. Pedagogics.* 2008;1(3-4):13-17. (in Russian)]
- Гусев Е.И., Коновалова А.Н., Скворцова В.И., Гехт А.Б. Неврология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. [Gusev E.I., Konovalova A.N., Skvortsova V.I., Geht A.B. *Neurology: The National Guide.* Moscow: GJeOTAR-Media Publ., 2009. (in Russian)]
- Дмитриева Т.Б., Шостакович Б.В. Агрессия и психическое здоровье. СПб.: Юридический центр Пресс, 2002. [Dmitrieva T.B., Shostakovich B.V. *Aggression and Mental Health.* St. Petersburg: Yuridichesky Center Publ., 2002. (in Russian)]
- Ильчибаева Т.В., Цыбко А.С., Кожемякина П.В., Науменко В.С. Экспрессия генов апоптоза в мозге крыс с генетически детерминированной защитно-оборонительной агрессией. *Молекуляр. биология.* 2016;50(5):814-820. DOI 10.7868/S0026898416030071. [Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Naumenko V.S. Expression of apoptosis genes in the brain of rats with genetically defined fear-induced aggression. *Molecular Biology (Moscow).* 2016;50(5):719-724. DOI 10.1134/S0026893316030079.]
- Казанцева А.В., Хуснутдинова Э.К. Гены vs Среда, или что управляет нашим поведением. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. [Kazantseva A.V., Khunutdinova E.K. *Genes vs Environment, or What Controls Our Behavior.* Ufa: Bashkirian State University, 2017. (in Russian)]
- Рагозинская В.Г. Особенности спектральной мощности ЭЭГ при аутоагрессии. *Изв. вузов. Уральский регион.* 2015;2:97-104. [Ragozinskaya V.G. Features of EEG spectral power in autoaggression. *Izvestiya Vysshih Uchebnykh Zavedenij. Uralskij Region = Proceedings of Higher Educational Institutions. Ural Region.* 2015; 2:97-104. (in Russian)]
- Росстат: Федеральная служба государственной статистики. 2017. Режим доступа: [http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat\\_main/rosstat/ru/statistics/population/](http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/). [Rosstat: Russian Federal State Statistics Service. 2017. Available at: [http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat\\_main/rosstat/ru/statistics/population/](http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/) (in Russian)]
- Ткаченко О.Н. Генетические корреляты агрессивности у человека: обзор литературы. *Соц.-экол. технологии.* 2016;3:68-86. [Tkachenko O.N. Genetic correlations of a person's aggression: literature review. *Socialno-Ecologicheskie Tekhnologii = Environment and Human: Environmental Studies.* 2016;3:68-86. (in Russian)]
- Тюзиков И.А., Калинин С.Ю., Ворслов Л.О., Тишова Ю.А. Вазопрессин: неклассические эффекты и роль в патогенезе ассоциированных с возрастом заболеваний. Эффективная фармакотерапия. 2015;26:38-50. [Tyuzikov I.A., Kalinchenko S.Yu., Vorslov L.O., Tishova Yu.A. Vasopressin: nonclassical effects and the role in the development of age-related diseases. *Effektivnaya Farmacoterapiya = Effective Pharmacotherapy.* 2015;26:38-50. (in Russian)]
- Черепкова Е.В., Афтанас Л.И., Максимов В.Н., Меньшанов П.Н. Частоты встречаемости вариантов 3' VNTR полиморфизма гена дофаминового транспортера *SLC6A3* у людей, склонных к антисоциальному поведению. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2016;162(7):95-98. [Cherepkova E.V., Aftanas L.I., Maksimov N., Menshanov P. Frequency of 3' VNTR polymorphism in the dopamine transporter gene *SLC6A3* in humans predisposed to antisocial behavior. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;162(1):82-85. DOI 10.1007/s10517-016-3551-7.]
- Albaugh M.D., Harder V.S., Althoff R.R., Rettew D.C., Ehli E.A., Lengyel-Nelson T., Davies G.E., Ayer L., Sulman J., Stanger C., Hudziak J.J. COMT Val158Met genotype as a risk factor for problem behaviors in youth. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 2010;49(8):841-849. DOI 10.1016/j.jaac.2010.05.015.
- Avinun R., Davidov M., Mankuta D., Knafo-Noam A. Predicting the use of corporal punishment: Child aggression, parent religiosity, and the BDNF gene. *Aggress. Behav.* 2018;44(2):165-175. DOI 10.1002/ab.21740.
- Beden O., Senol E., Atay S., Ak H., Altintoprak A.E., Kiyan G.S., Petin B., Yaman U., Aydin H.H. TPH1 A218 allele is associated with suicidal behavior in Turkish population. *Leg. Med. (Tokyo).* 2016;21:15-18. DOI 10.1016/j.legalmed.2016.05.005.
- Berezcki E., Branca R.M., Francis P.T., Pereira J.B., Baek J.H., Hortobágyi T., Winblad B., Ballard C., Lehtiö J., Aarsland D. Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Brain.* 2018;141(2):582-595. DOI 10.1093/brain/awx352.
- Blanco E.A., Duque L.M., Rachamalla V., Yuen E., Kane J.M., Gallego J.A. Predictors of aggression in 3.322 patients with affective disorders and schizophrenia spectrum disorders evaluated in an emergency department setting. *Schizophr. Res.* 2018;195:136-141. DOI 10.1016/j.schres.2017.10.002.
- Brevik E.J., van Donkelaar M.M., Weber H., Sánchez-Mora C., Jacob C., Rivero O., Kittel-Schneider S., Garcia-Martínez I., Aebi M., van Hulzen K., Cormand B., Ramos-Quiroga J.A., Lesch K.P., Reif A., Ribasés M., Franke B., Posserud M.B., Johansson S., Lundervold A.J., Haavik J., Zayats T. Genome-wide analyses of aggressiveness in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr.* 2016;171(5):733-747. DOI 10.1002/ajmg.b.32434.
- Butovskaya M.L., Lazebny O.E., Vasilyev V.A., Dronova D.A., Karelin D.V., Mabulla A.Z., Shibalev D.V., Shackelford T.K., Fink B., Ryskov A.P. Androgen receptor gene polymorphism, aggression, and reproduction in tanzanian foragers and pastoralists. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136208. DOI 10.1371/journal.pone.0136208.
- Calcagnoli F., de Boer S.F., Beiderbeck D.I., Althaus M., Koolhaas J.M., Neumann I.D. Local oxytocin expression and oxytocin receptor binding in the male rat brain is associated with aggressiveness. *Behav. Brain Res.* 2014;261:315-322. DOI 10.1016/j.bbr.2013.12.050.
- Cherepkova E.V., Maksimov V.N., Aftanas L.I., Menshanov P.N. Genotype and haplotype frequencies of the DRD4 VNTR polymorphism in the men with no history of ADHD, convicted of violent crimes. *J. Crim. Justice.* 2015;43(6):464-469. DOI 10.1016/j.jcrimjus.2015.10.002.
- Cicchetti D., Rogosch F.A., Thibodeau E. The effects of child maltreatment on early signs of antisocial behavior: genetic moderation by tryptophan hydroxylase, serotonin transporter, and monoamine oxidase-a-genes. *Dev. Psychopathol.* 2012;24(3):907-928. DOI 10.1017/S0954579412000442.
- Gansler D.A., McLaughlin N.C., Iguchi L., Jerram M., Moore D.W., Bhadelia R., Fulwiler C. A multivariate approach to aggression and the orbital frontal cortex in psychiatric patients. *Psychiatry Res.* 2009;171(3):145-154. DOI 10.1016/j.psychres.2008.03.007.
- Georgiev A.V., Klimczuk A.C.E., Traficante D.M., Maestripieri D. When violence pays: a cost-benefit analysis of aggressive behavior in animals and humans. *Evol. Psychol.* 2013;11(3):678-699.
- Gorodetsky E., Carli V., Sarchiapone M., Roy A., Goldman D., Enoch M.A. Predictors for self-directed aggression in Italian prisoners include externalizing behaviors, childhood trauma and the serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR. *Genes Brain Behav.* 2016;15(5):465-473. DOI 10.1111/gbb.12293.
- Guan X., Dong Z.Q., Tian Y.Y., Wu L.N., Gu Y., Hu Z.Q., Zhang X. Lack of association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and aggressive behavior in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2014;215(1):244-245. DOI 10.1016/j.psychres.2013.10.017.
- Gutzler S.J., Karom M., Erwin W.D., Albers H.E. Arginine-vasopressin and the regulation of aggression in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Eur. J. Neurosci.* 2010;31(9):1655-1663. DOI 10.1111/j.1460-9568.2010.07190.x.
- Hemmings S.M.J., Xulu K., Sommer J., Hinsberger M., Malan-Muller S., Tromp G., Elbert T., Weierstall R., Seedat S. Appetitive and reactive aggression are differentially associated with the STin2 genetic variant in the serotonin transporter gene. *Sci. Rep.* 2018;8: 6714. DOI 10.1038/s41598-018-25066-8.
- Holz N., Boecker R., Buchmann A.F., Blomeyer D., Baumeister S., Hohmann S., Jennen-Steinmetz C., Wolf I., Rietschel M., Witt S.H., Plichta M.M., Meyer-Lindenberg A., Schmidt M.H., Esser G., Bana-

- schewski T., Brandeis D., Laucht M. Evidence for a sex-dependent *MAOA* × Childhood stress interaction in the neural circuitry of aggression. *Cereb. Cortex.* 2016;26(3):904-914. DOI 10.1093/cercor/bhu249.
- Hong C.J., Liou Y.J., Tsai S.J. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res. Bull.* 2011;86(5-6):287-297. DOI 10.1016/j.brainresbull.2011.08.019.
- Hovey D., Lindstedt M., Zettergren A., Jonsson L., Johansson A., Melke J., Kerekes N., Anckarsäter H., Lichtenstein P., Lundström S., Westberg L. Antisocial behavior and polymorphisms in the oxytocin receptor gene: findings in two independent samples. *Mol. Psychiatry.* 2016;21(7):983-988. DOI 10.1038/mp.2015.144.
- Hygen B.W., Belsky J., Stenseng F., Lydersen S., Guzey I.C., Wichstrøm L. Child exposure to serious life events, COMT, and aggression: Testing differential susceptibility theory. *Dev. Psychol.* 2015; 51(8):1098-1104. DOI 10.1037/dev0000020.
- Jager A., Amiri H., Bielczyk N., van Heukelum S., Heerschap A., Aschrafi A., Poelmans G., Buitelaar J.K., Kozicz T., Glennon J.C. Cortical control of aggression: GABA signalling in the anterior cingulate cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2017. DOI 10.1016/j.euroneuro.2017.12.007.
- Kiive E., Laas K., Vaht M., Veidebaum T., Harro J. Stressful life events increase aggression and alcohol use in young carriers of the *GABRA2* rs279826/rs279858 A-allele. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2017;27(8):816-827. DOI 10.1016/j.euroneuro.2017.02.003.
- King A.R., Ratzak A., Ballantyne S., Knutson S., Russell T.D., Pogalz C.R., Breen C.M. Differentiating corporal punishment from physical abuse in the prediction of lifetime aggression. *Agress. Behav.* 2018;44(3):306-315. DOI 10.1002/ab.21753.
- Koh K.B., Kim C.H., Choi E.H., Lee Y.J., Seo W.Y. Effect of tryptophan hydroxylase gene polymorphism on aggression in major depressive disorder and undifferentiated somatoform disorder. *J. Clin. Psychiatry.* 2012;73(5):e574-e579. DOI 10.4088/JCP.11m07342.
- Kretschmer T., Vitaro F., Barker E.D. The association between peer and own aggression is moderated by the BDNF Val-Met polymorphism. *J. Res. Adolesc.* 2014;24(1):177-185. DOI 10.1111/jora.12050.
- Laas K., Kiive E., Mäestu J., Vaht M., Veidebaum T., Harro J. Nice guys: Homozygosity for the TPH2 -703G/T (rs4570625) minor allele promotes low aggressiveness and low anxiety. *J. Affect Disord.* 2017;215:230-236. DOI 10.1016/j.jad.2017.03.045.
- Lee R., Ferris C., Van de Kar L.D., Coccaro E.F. Cerebrospinal fluid oxytocin, life history of aggression, and personality disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(10):1567-1573. DOI 10.1016/j.psyneuen.2009.06.002.
- Lopez-Castroman J., Jaussent I., Beziat S., Guillaume S., Baca-Garcia E., Genty C., Olié E., Courtet P. Increased severity of suicidal behavior in impulsive aggressive patients exposed to familial adversities. *Psychol. Med.* 2014;44(14):3059-3068. DOI 10.1017/S0033291714000646.
- MacKenzie A., Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(26):15251-15255.
- Malik A.I., Zai C.C., Berall L., Abu Z., Din F., Nowrouzi B., Chen S., Beitchman J.H. The role of genetic variants in genes regulating the oxytocin-vasopressin neurohumoral system in childhood-onset aggression. *Psychiatr. Genet.* 2014;24(5):201-210. DOI 10.1097/YPG.0000000000000044.
- Meyer-Bahlburg H.F.L. Sex chromosomes and aggression in humans. In: Brain P.P., Benton D. (Eds.) *The Biology of Aggression*. Rockville: MD, 1981;109-123.
- Mick E., McGough J., Deutsch C.K., Frazier J.A., Kennedy D., Goldberg R.J. Genome-Wide Association Study of proneness to anger. *PLoS One.* 2014;9(1):e87257. DOI 10.1371/journal.pone.0087257.
- Miczek K.A., de Almeida R.M., Kravitz E.A., Rissman E.F., de Boer S.F., Raine A. Neurobiology of escalated aggression and violence. *J. Neurosci.* 2007;27(44):11803-11806. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3500-07.2007.
- Nagata T., Kobayashi N., Shinagawa S., Yamada H., Kondo K., Nakayama K. Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2014;121(4):433-441. DOI 10.1007/s00702-013-1121-y.
- Pappa I., St Pourcain B., Benke K., Cavadino A., Hakulinen C., Nivard M.G., Nolte I.M., Tiesler C.M., Bakermans-Kranenburg M.J., Davies G.E., Evans D.M., Geoffroy M.C., Grallert H., Groen-Blokhuys M.M., Hudziak J.J., Kemp J.P., Keltikangas-Järvinen L., McMahon G., Mileva-Seitz V.R., Motazed E., Power C., Raitakari O.T., Ring S.M., Rivadeneira F., Rodriguez A., Scheet P.A., Seppälä I., Snieder H., Standl M., Thiering E., Timpson N.J., Veenstra R., Velders F.P., Whitehouse A.J., Smith G.D., Heinrich J., Hypnponen E., Lehtimäki T., Middeldorp C.M., Oldehinkel A.J., Pennell C.E., Boomsma D.I., Tiemeier H. A genome-wide approach to children's aggressive behavior: *The EAGLE consortium*. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2015;171(5):562-572. DOI 10.1002/ajmg.b.32333.
- Pardini D.A., Raine A., Erickson K., Loeber R. Lower amygdala volume in men is associated with childhood aggression, early psychopathic traits, and future violence. *Biol. Psychiatry.* 2014;75(1):73-80. DOI 10.1016/j.biopsych.2013.04.003.
- Parrott A.M., Mathews M.B. Novel rapidly evolving hominid RNAs bind nuclear factor 90 and display tissue-restricted distribution. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(18):6249-6258. DOI 10.1093/nar/gkm668.
- Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry (Moscow).* 2017;82(3):308-317. DOI 10.1134/S0006297917030099.
- Qadeer M.I., Amar A., Mann J.J., Hasnain S. Polymorphisms in dopaminergic system genes; association with criminal behavior and self-reported aggression in violent prison inmates from Pakistan. *PLoS One.* 2017;12(6):e0173571. DOI 10.1371/journal.pone.0173571.
- Rajender S., Pandu G., Sharma J.D., Gandhi K.P., Singh L., Thangaraj K. Reduced CAG repeats length in androgen receptor gene is associated with violent criminal behavior. *Int. J. Legal Med.* 2008; 122(5):367-372. DOI 10.1007/s00414-008-0225-7.
- Rautiainen M.R., Paunio T., Repo-Tiihonen E., Virkkunen M., Ollila H.M., Sulkava S., Jolanki O., Palotie A., Tiihonen J. Genome-wide association study of antisocial personality disorder. *Transl. Psychiatry.* 2016;6(9):e883. DOI 10.1038/tp.2016.155.
- Rujescu D., Giegling I., Mandelli L., Schneider B., Hartmann A.M., Schnabel A., Maurer K., Möller H.J., Serretti A. NOS-I and -III gene variants are differentially associated with facets of suicidal behavior and aggression-related traits. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2008;147B(1):42-48. DOI 10.1002/ajmg.b.30569.
- Schlomer G.L., Cleveland H.H., Vandenberg D.J., Feinberg M.E., Neiderhiser J.M., Greenberg M.T., Spoth R., Redmond C. Developmental differences in early adolescent aggression: a gene × environment × intervention analysis. *J. Youth Adolesc.* 2015;44(3):581-597. DOI 10.1007/s10964-014-0198-4.
- Schlüter T., Winz O., Henkel K., Eggermann T., Mohammadkhani-Shali S., Dietrich C., Heinzl A., Decker M., Cumming P., Zerres K., Piel M., Mottaghy F.M., Vernaleken I. MAOA-VNTR polymorphism modulates context-dependent dopamine release and aggressive behavior in males. *Neuroimage.* 2016;125:378-385. DOI 10.1016/j.neuroimage.2015.10.031.
- Siddiqui T.J., Tari P.K., Connor S.A., Zhang P., Dobie F.A., She K., Kawabe H., Wang Y.T., Brose N., Craig A.M. An LRRMT4-HSPG complex mediates excitatory synapse development on dentate gyrus granule cells. *Neuron.* 2013;79(4):680-695. DOI 10.1016/j.neuron.2013.06.029.
- Singh J.P., Volavka J., Czobor P., Van Dorn R.A. A meta-analysis of the Val158Met COMT polymorphism and violent behavior in schizophrenia. *PLoS One.* 2012;7(8):e43423. DOI 10.1371/journal.pone.0043423.
- Stochholm K., Bojesen A., Jensen A.J., Juul S., Gravholt C.H. Criminality in men with Klinefelter's syndrome and XYY syndrome: a

- cohort study. *BMJ Open*. 2012;2:e000650. DOI 10.1136/bmjopen-2011-000650.
- Takeuchi H., Tomita H., Taki Y., Kikuchi Y., Ono C., Yu Z., Sekiguchi A., Nouchi R., Kotozaki Y., Nakagawa S., Miyauchi C.M., Iizuka K., Yokoyama R., Shinada T., Yamamoto Y., Hanawa S., Araki T., Hashizume H., Kunitoki K., Sassa Y., Kawashima R. Cognitive and neural correlates of the 5-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene in a population lacking the 7-repeat allele. *Neuroimage*. 2015;110:124-35. DOI 10.1016/j.neuroimage.2015.01.053.
- Tielbeek J.J., Johansson A., Polderman T.J.C., Rautiainen M.R., Jansen P., Taylor M., Tong X., Lu Q., Burt A.S., Tiemeier H., Viding E., Plomin R., Martin N.G., Heath A.C., Madden P.A.F., Montgomery G., Beaver K.M., Waldman I., Gelernter J., Kranzler H.R., Farrer L.A., Perry J.R.B., Munafò M., LoParo D., Paunio T., Tiihonen J., Mous S.E., Pappa I., de Leeuw C., Watanabe K., Hammerslag A.R., Salvatore J.E., Aliev F., Bigdeli T.B., Dick D., Faraone S.V., Popma A., Medland S.E., Posthuma D. Genome-Wide Association Studies of a broad spectrum of antisocial behavior. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(12):1242-1250. DOI 10.1001/jamapsychiatry.2017.3069.
- Tielbeek J.J., Medland S.E., Benyamin B., Byrne E.M., Heath A.C., Madden P.A., Martin N.G., Wray N.R., Verweij K.J. Unraveling the genetic etiology of adult antisocial behavior: a genome-wide association study. *PLoS One*. 2012;7(10):e45086. DOI 10.1371/journal.pone.0045086.
- Tiihonen J., Rautiainen M.R., Ollila H.M., Repo-Tiihonen E., Virkkunen M., Palotie A., Pietiläinen O., Kristiansson K., Joukamaa M., Lauerma H., Saarela J., Tyni S., Vartiainen H., Paananen J., Goldman D., Paunio T. Genetic background of extreme violent behavior. *Mol. Psychiatry*. 2015;20(6):786-792. DOI 10.1038/mp.2014.130.
- Tuvblad C., Narusyte J., Grann M., Sarnecki J., Lichtenstein P. The genetic and environmental etiology of antisocial behavior from childhood to emerging adulthood. *Behav. Genet*. 2011;41(5):629-640. DOI 10.1007/s10519-011-9463-4.
- United Nations Office on Drugs and Crime "UNODC": Reports on world crime trends. 2017. Available at: <https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/statistics/crime/reports-on-world-crime-trends.html>
- Vaillancourt K.L., Dinsdale N.L., Hurd P.L. Estrogen receptor 1 promoter polymorphism and digit ratio in men. *Am. J. Hum. Biol*. 2012;24(5):682-689. DOI 10.1002/ajhb.22297.
- Van Donkelaar M.M.J., Hoogman M., Pappa I., Tiemeier H., Buitelaar J.K., Franke B., Bralten J. Pleiotropic contribution of *MECOM* and *AVPR1A* to aggression and subcortical brain volumes. *Front. Behav. Neurosci*. 2018;12:61. DOI 10.3389/fnbeh.2018.00061.
- Van Ijzendoorn M.H., Belsky J., Bakermans-Kranenburg M.J. Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies. *Transl. Psychiatry*. 2012;2:e147. DOI 10.1038/tp.2012.73.
- VanNess S.H., Owens M.J., Kilts C.D. The variable number of tandem repeats element in *DAT1* regulates *in vitro* dopamine transporter density. *BMC Genet*. 2005;6:55. DOI 10.1186/1471-2156-6-55.
- Vermeersch H., T'sjoen G., Kaufman J.M., Van Houtte M. ESR1 polymorphisms, daily hassles, anger expression, and depressive symptoms in adolescent boys and girls. *Horm. Behav*. 2013;63(3):447-453. DOI 10.1016/j.yhbeh.2012.11.017.
- Viding E., Blair R.J., Moffitt T.E., Plomin R. Evidence for substantial genetic risk for psychopathy in 7-year-olds. *J. Child Psychol. Psychiatr*. 2005;46(6):592-597. DOI 10.1111/j.1469-7610.2004.00393.x.
- Wagner S., Baskaya Ö., Dahmen N., Lieb K., Tadić A. Modulatory role of the brain-derived neurotrophic factor Val<sup>66</sup>Met polymorphism on the effects of serious life events on impulsive aggression in borderline personality disorder. *Genes Brain Behav*. 2010;9(1):97-102. DOI 10.1111/j.1601-183X.2009.00539.x.
- Walewong O., Laslett A.M., Chenhall R., Room R. Harm from others' drinking-related aggression, violence and misconduct in five Asian countries and the implications. *Int. J. Drug Policy*. 2018;56:101-107. DOI 10.1016/j.drugpo.2018.03.015.
- Waller R., Corral-Frias N.S., Vannucci B., Bogdan R., Knodt A.R., Hariri A.R., Hyde L.W. An oxytocin receptor polymorphism predicts amygdala reactivity and antisocial behavior in men. *Soc. Cogn. Affect Neurosci*. 2016;11(8):1218-1226. DOI 10.1093/scan/nsw042.
- Wendland J.R., Martin B.J., Kruse M.R., Lesch K.P., Murphy D.L. Simultaneous genotyping of four functional loci of human *SLC6A4*, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol. Psychiatry*. 2006;11(3):224-226. DOI 10.1038/sj.mp.4001789.
- Wersinger S.R., Ginns E.I., O'Carroll A.M., Lolait S.J., Young W.S. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol. Psychiatry*. 2002;7:975-984. DOI 10.1038/sj.mp.4001195.
- Willour V.L., Seifuddin F., Mahon P.B., Jancic D., Pirooznia M., Steele J., Schweizer B., Goes F.S., Mondimore F.M., Mackinnon D.F., Bipolar Genome Study Consortium, Perlis R.H., Lee P.H., Huang J., Kelsoe J.R., Shilling P.D., Rietschel M., Nöthen M., Cichon S., Gurling H., Purcell S., Smoller J.W., Craddock N., Depaulo J.R., Schulze T.G., McMahon F.J., Zandi P.P., Potash J.B. A genome-wide association study of attempted suicide. *Mol. Psychiatry*. 2012;17(4):433-444. DOI 10.1038/mp.2011.4.
- Willour V.L., Zandi P.P., Badner J.A., Steele J., Miao K., Lopez V., MacKinnon D.F., Mondimore F.M., Schweizer B., McInnis M.G., Miller E.B., Depaulo J.R., Gershon E.S., McMahon F.J., Potash J.B. Attempted suicide in bipolar disorder pedigrees: evidence for linkage to 2p12. *Biol. Psychiatry*. 2007;61(5):725-727. DOI 10.1016/j.biopsych.2006.05.014.
- Yang L., Wang F., Wang M., Han M., Hu L., Zheng M., Ma J., Kang Y., Wang P., Sun H., Zuo W., Xie L., Wang A., Yu D., Liu Y. Association between oxytocin and receptor genetic polymorphisms and aggression in a northern Chinese Han population with alcohol dependence. *Neurosci. Lett*. 2017;636:140-144. DOI 10.1016/j.neulet.2016.10.066.
- Yoon H.K., Lee H.J., Kim L., Lee M.S., Ham B.J. Impact of tryptophan hydroxylase 2 G-703T polymorphism on anger-related personality traits and orbitofrontal cortex. *Behav. Brain Res*. 2012;231(1):105-110.
- Young S.E., Smolen A., Corley R.P., Krauter K.S., DeFries J.C., Crowley T.J., Hewitt J.K. Dopamine transporter polymorphism associated with externalizing behavior problems in children. *Am. J. Med. Genet*. 2002;114(2):144-149.
- Zai C.C., Muir K.E., Nowrouzi B., Shaikh S.A., Choi E., Berall L., Trépanier M.O., Beitchman J.H., Kennedy J.L. Possible genetic association between vasopressin receptor 1B and child aggression. *Psychiatry Res*. 2012;200(2-3):784-788. DOI 10.1016/j.psychres.2012.07.031.
- Zhang Y., Ming Q., Wang X., Yao S. The interactive effect of the *MAOA*-VNTR genotype and childhood abuse on aggressive behaviors in Chinese male adolescents. *Psychiatr. Genet*. 2016;26(3):117-123. DOI 10.1097/YPG.0000000000000125.

#### ORCID ID

J.D. Davydova [orcid.org/0000-0003-3508-4710](https://orcid.org/0000-0003-3508-4710)  
 S.S. Litvinov [orcid.org/0000-0002-5999-149X](https://orcid.org/0000-0002-5999-149X)  
 R.F. Enikeeva [orcid.org/0000-0002-4301-5283](https://orcid.org/0000-0002-4301-5283)  
 S.B. Malых [orcid.org/0000-0002-3786-7447](https://orcid.org/0000-0002-3786-7447)  
 E.K. Khusnutdinova [orcid.org/0000-0003-2987-3334](https://orcid.org/0000-0003-2987-3334)

# Анализ мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* при каротидных параганглиомах

Е.Н. Лукьянова<sup>1</sup>, А.В. Снежкина<sup>1</sup>, Д.В. Калинин<sup>2</sup>, А.В. Покровский<sup>2</sup>, А.Л. Головюк<sup>2</sup>, О.А. Степанов<sup>1</sup>, Е.А. Пудова<sup>1</sup>, Г.С. Размахаев<sup>3</sup>, М.В. Орлова<sup>4</sup>, А.П. Поляков<sup>3</sup>, М.В. Киселева<sup>3</sup>, А.Д. Каприн<sup>3</sup>, А.В. Кудрявцева<sup>1, 3</sup> 

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт хирургии им. А.В. Вишневского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Каротидные параганглиомы (КПГ) – редкие нейроэндокринные опухоли, которые развиваются из параганглионарной ткани каротидного тельца и располагаются в области бифуркации сонной артерии. Эти опухоли характеризуются медленным ростом, однако в ряде случаев наблюдается агрессивное течение заболевания и метастазирование. Операции по удалению каротидных параганглиом сопряжены с высоким риском осложнений, в то время как лучевая и химиотерапия малоэффективны. Изучение молекулярного патогенеза КПГ может способствовать разработке новых подходов к терапии и открытию биомаркеров. Ранее нами выполнено высокопроизводительное секвенирование экзома 52 архивных образцов КПГ, одной из задач которого была оценка мутационной нагрузки. Из-за отсутствия парных образцов гистологически нормальных тканей или крови потенциально герминальные мутации были исключены из выборки с использованием баз данных 1000 Genomes Project и ExAC при строгих параметрах фильтрации. В настоящем исследовании проанализированы десять генов (*ZNF717*, *CDC27*, *FRG2C*, *FAM104B*, *CTBP2*, *HLA-DRB1*, *HYDIN*, *KMT5A*, *MUC3A* и *PRSS3*), характеризующихся наиболее высокой мутационной нагрузкой. В четырех генах (*CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*) идентифицированы потенциально патогенные мутации, согласно нескольким предсказательным алгоритмам (SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster и LRT). Многие выявленные мутации оказались представленными в большом количестве образцов выборки, что заставило проверить их соматический статус с использованием дополнительных данных секвенирования экзома крови, выполненного с таким же набором для экзомного обогащения, как и при анализе опухолей КПГ. Обнаружено, что значительное число выявленных потенциально патогенных мутаций являются герминальными, что, по-видимому, связано с наличием ошибок аннотации в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC. Однако часть идентифицированных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* остаются предположительно патогенными, кроме того, имеются многочисленные данные о вовлеченности этих генов в формирование и прогрессию других видов опухолей. Это позволяет считать гены *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* потенциально связанными с патогенезом КПГ и требует обратить на них особое внимание в дальнейших исследованиях. Таким образом, необходимо совершенствовать методики для выявления онко-ассоциированных генов и патогенных мутаций.

Ключевые слова: каротидные параганглиомы; экзом; мутационная нагрузка; мутации; высокопроизводительное секвенирование.

## Analysis of mutations in *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* and *KMT5A* genes in carotid paragangliomas

E.N. Lukyanova<sup>1</sup>, A.V. Snezhkina<sup>1</sup>, D.V. Kalinin<sup>2</sup>, A.V. Pokrovsky<sup>2</sup>, A.L. Golovyuk<sup>2</sup>, O.A. Stepanov<sup>1</sup>, E.A. Pudova<sup>1</sup>, G.S. Razmakhaev<sup>3</sup>, M.V. Orlova<sup>4</sup>, A.P. Polyakov<sup>3</sup>, M.V. Kiseleva<sup>3</sup>, A.D. Kaprin<sup>3</sup>, A.V. Kudryavtseva<sup>1, 3</sup> 

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Vishnevsky Institute of Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>3</sup> National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Carotid paragangliomas (CPGLs) are rare neuroendocrine tumors that arise from paraganglionic tissue of the carotid body localizing at the bifurcation of carotid artery. These tumors are slowly growing, but occasionally they become aggressive and metastatic. Surgical treatment remains high-risk and extremely challenging; radiation and chemotherapy are poorly effective. The study of molecular pathogenesis of CPGLs will allow developing novel therapeutic approaches and revealing biomarkers. Previously, we performed the exome sequencing of 52 CPGLs and estimated mutational load (ML). Paired histologically normal tissues or blood were unavailable, so potentially germline mutations were excluded from the analysis with strong filtering conditions using 1000 Genomes Project and ExAC databases. In this work, ten genes (*ZNF717*, *CDC27*, *FRG2C*, *FAM104B*, *CTBP2*, *HLA-DRB1*, *HYDIN*, *KMT5A*, *MUC3A*, and *PRSS3*) characterized by the highest level of mutational load were analyzed. Using several prediction algorithms (SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, and LRT), potentially pathogenic mutations were identified in four genes (*CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN*, and *KMT5A*). Many of these mutations occurred in the majority of cases, and their mutation type was checked using exome sequencing data of blood prepared with the same exome enrichment kit that was used for preparation of exome libraries from CPGLs. The majority of the mutations were germline that can apparently be associated with annotation errors in 1000 Genomes Project and ExAC. However, part of the mutations identified in *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN*, and *KMT5A* remain potentially pathogenic, and there is a large body of data on the involvement of these genes in the formation and progression of other tumors. This allows considering

*CDC27, CTBP2, HYDIN, and KMT5A* genes as potentially associated with CPGL pathogenesis and requires taking them into account in further investigations. Thus, there is a necessity to improve the methods for identification of cancer-associated genes as well as pathogenic mutations.

Key words: carotid paragangliomas; exome; mutation load; mutations; high-throughput sequencing.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лукьянова Е.Н., Снежкина А.В., Калинин Д.В., Покровский А.В., Головюк А.Л., Степанов О.А., Пудова Е.А., Размахаев Г.С., Орлова М.В., Поляков А.П., Киселева М.В., Каприн А.Д., Кудрявцева А.В. Анализ мутаций в генах *CDC27, CTBP2, HYDIN* и *KMT5A* при каротидных параганглиомах. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):726-733. DOI 10.18699/VJ18.416

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lukyanova E.N., Snezhkina A.V., Kalinin D.V., Pokrovsky A.V., Golovyuk A.L., Stepanov O.A., Pudova E.A., Razmakhaev G.S., Orlova M.V., Polyakov A.P., Kiseleva M.V., Kaprin A.D., Kudryavtseva A.V. Analysis of mutations in *CDC27, CTBP2, HYDIN* and *KMT5A* genes in carotid paragangliomas. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):726-733. DOI 10.18699/VJ18.416 (in Russian)

Параганглиомы – редкие нейроэндокринные опухоли, которые характеризуются высокой генетической гетерогенностью (Favier et al., 2015). Около 3 % всех параганглиом располагаются в области головы и шеи. Наиболее распространены из них каротидные параганглиомы (КПГ), которые образуются из каротидного тельца, располагающегося в области бифуркации сонной артерии. В 25–40 % случаев параганглиомы ассоциированы с мутациями, которые могут приводить к двум основным вариантам нарушений: 1) изменению путей, связанных с гипоксией (*SDHx, VHL* и *PHD*); 2) дерегуляции онко-ассоциированных путей, в которые вовлечены протоонкоген *RET*, а также гены-супрессоры опухолевого роста *NF1, TMEM127, MAX* и *KIF1Bβ* (Nölting, Grossman, 2012). Мутации в этих генах встречаются как в случае наследственных семейных опухолевых синдромов, так и при спорадических формах опухолей (Unlü et al., 2009; Favier, Gimenez-Roqueplo, 2012). По-видимому, эти два варианта нарушений связаны с разными типами развития параганглиом; опухоли в состоянии псевдогипоксии характеризуются aberrантной активацией фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), повышенной васкуляризацией, снижением интенсивности окислительно-восстановительных реакций, в то время как опухоли второй группы ассоциированы с активацией сигнальных путей *PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK* и *mTORC1/p70S6K*, а также нейрональными и нейроэндокринными нарушениями. Эти группы подразделяют на следующие подгруппы: 1А и 1В, которые включают параганглиомы с мутациями в генах *SDHx* и *VHL* соответственно; подгруппу 2А, содержащую опухоли с мутациями в генах *RET, MAX, NF1, TMEM127* и *KIF1Bβ*; подгруппы 2В и 2С, в которые включены спорадические опухоли, и 2D – подгруппу опухолей, не содержащих известных мутаций (Zhikrivetskaya et al., 2017).

Единственным методом лечения КПГ является хирургическое удаление опухоли, так как лучевая и химиотерапия малоэффективны. Однако в связи с близким расположением к сонной артерии и крупным нервам, операции по удалению этих опухолей сопряжены с высоким риском осложнений. Изучение молекулярного патогенеза каротидных параганглиом необходимо для разработки новых терапевтических подходов и выявления маркеров, определяющих клинические особенности течения заболевания. В настоящее время диагностические и прогностические

биомаркеры данного заболевания ограничены и обладают низкой чувствительностью и специфичностью (Plouin et al., 2016).

В последние годы весьма эффективным методом лечения ряда онкологических заболеваний показала себя иммунотерапия ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (Bracarda et al., 2015). Одним из многообещающих предиктивных биомаркеров ответа опухоли на иммунотерапию является мутационная нагрузка (МН) – количество соматических мутаций, нормированных на одну мегабазу (1 млн п. н.) кодирующей последовательности ДНК человека (Topalian et al., 2016). В результате возникновения большого количества соматических мутаций в опухолях появляются новые формы белков – неоантигены, которые отсутствуют в нормальных клетках (Chabanon et al., 2016). Иммунные клетки распознают их как чужеродные, что вызывает устойчивый Т-клеточный ответ. Таким образом, уровень мутационной нагрузки коррелирует с ответом на иммунотерапию (Alexandrov et al., 2013; Van Allen et al., 2015).

Исследование уровня мутационной нагрузки при различных опухолях является как фундаментальной, так и актуальной прикладной задачей. Ранее нами на основании анализа секвенирования экзома 52 образцов опухолей была впервые проведена оценка мутационной нагрузки при КПГ (Snezhkina et al., 2018). Выявлено, что несколько генов характеризуются существенно повышенным количеством потенциально соматических «вредных» (приводящих к изменению структуры белка) мутаций по сравнению с другими генами. Предполагается, что эти гены могут играть важную роль в патогенезе каротидных параганглиом. Это послужило основой для их детального анализа.

#### Материалы и методы

В работе использованы результаты секвенирования экзома 52 архивных образцов каротидных параганглиом (Snezhkina et al., 2018). Ранее на основе этих данных нами были идентифицированы гены, характеризующиеся наиболее высокой мутационной нагрузкой. В связи с невозможностью получить для архивного материала парные образцы крови, а также с отсутствием прилегающей гистологически нормальной ткани, для сравнения были взяты данные ExAC и 1000 Genomes Project. Для

удаления максимального количества герминальных мутаций использовались строгие параметры: из анализа исключены все мутации, встречающиеся в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC с частотой более 2 % (Snezhkina et al., 2018).

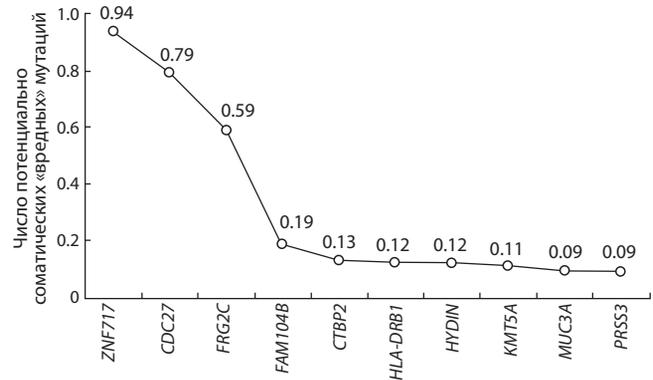
В топ-10 генах проанализированы мутации с применением наиболее распространенных алгоритмов, предсказывающих их патогенность: SIFT, PolyPhen2, MutationTaster и LRT. Для дальнейшего анализа выбрано четыре гена *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*, в остальных генах большинство вариантов оказались нейтральными. Для анализа типа (герминального или соматического) выявленных вариантов выполнено секвенирование экзома трех образцов периферической крови больных КПП. Выделение ДНК проводилось на станции для автоматического выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure Compact System (Roche, Швейцария) с использованием набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche). Экзомные библиотеки подготавливались при помощи набора TruSeq Exome Library Prep Kit (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Высокопроизводительное секвенирование проведено на приборе NextSeq 500 System (Illumina) в режиме парных прочтений (76 × 2). Оценка качества чтений выполнена с помощью FastQC, для очистки чтений использовали программу Trimmomatic. Далее с помощью BWA-MEM проведено картирование прочтений на референсный геном человека (GRCh37/hg19). Для обработки прочтений использовали программный пакет SAMtools. Идентификацию мутаций осуществляли с помощью программы vcfFilter пакета vcfLib, аннотацию вариантов – с использованием SnpSift пакета snpEff.

## Результаты

### Потенциально патогенные мутации в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*

Ранее в единственной работе, посвященной оценке мутационной нагрузки при КПП, нами показано, что в нескольких генах обнаруживается существенно повышенное количество мутаций (в пересчете на одну мегабазу кодирующего региона генома) по сравнению с другими генами (Snezhkina et al., 2018). Был использован единственный доступный алгоритм анализа, основанный на биоинформатической фильтрации соматических мутаций при помощи баз данных 1000 Genomes Project и ExAC. Выявлено десять генов – *ZNF717*, *CDC27*, *FRG2C*, *FAM104B*, *CTBP2*, *HLA-DRB1*, *HYDIN*, *KMT5A*, *MUC3A* и *PRSS3*, характеризующихся повышенным количеством потенциально соматических «вредных» мутаций (см. рисунок).

В исследуемых генах детально проанализированы все выявленные варианты с использованием алгоритмов, предсказывающих их патогенность (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster и LRT), а также методы расчета эволюционной консервативности позиций (PhastCons и PhyloP). Большинство потенциально патогенных мутаций обнаружено в четырех генах: *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* (см. таблицу). Мутации в остальных генах, согласно большинству предсказательных алгоритмов, были преимущественно нейтральными. Проведен анализ



Распределение генов согласно частоте потенциально соматических «вредных» мутаций.

Проанализированы только мутации, приводящие к изменению структуры белка: несинонимичные (нонсенс- и миссенс-) мутации, а также мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. Из анализа исключены все мутации, встречающиеся в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC с частотой более 2 %. Число мутаций в гене при оценке МН нормировалось на 1 млн п. н. кодирующей последовательности ДНК человека. При анализе учитывались длина гена при секвенировании и размер экзома в зависимости от дизайна проб в наборе для экзомного обогащения.

литературы для установления роли генов *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* в развитии онкологических заболеваний. Оказалось, что все четыре гена описаны ранее как онкоассоциированные, что предварительно подтверждало предположение об их возможной роли в патогенезе КПП. Однако при детальном рассмотрении выявленных потенциально патогенных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* оказалось, что значительная часть из них характерна почти для всех образцов выборки. Более того, эти мутации встречаются в некоторых образцах в гомозиготном состоянии. Сделано предположение, что выявленные мутации, по-видимому, представляют собой герминальные варианты, что может быть связано с ошибками аннотации или отсутствием этих мутаций в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC. Помимо этого, вероятным объяснением также могут быть ошибки секвенирования. Однако не следует исключать возможность, что эти мутации характерны именно для КПП.

### Сопоставление данных секвенирования опухолевой ткани КПП и крови для уточнения типа мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*

В результате дополнительного анализа данных высокопроизводительного секвенирования экзома трех образцов крови обнаружено, что значительная часть идентифицированных потенциально патогенных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A* при КПП являются герминальными. Так, из 33 выявленных мутаций только восемь с высокой вероятностью могут быть соматическими (см. таблицу).

## Обсуждение

Нами проведен анализ десяти генов, в которых ранее при КПП выявлено наибольшее количество потенциально «вредных» мутаций при нормировании на одну мегабазу кодирующих последовательностей ДНК (Snezhkina et al.,

Потенциально патогенные мутации в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*, выявленные при помощи первичного анализа, а также результаты уточнения их типа (герминальные или соматические)

Ген	Транскрипт	Идентификатор мутации	Позиция на хромосоме	Генотип/ число образцов	Мутация кДНК	Аминокислота	Число образцов с мутацией
<i>CDC27</i>	NM_001114091	–	chr17: 45,235,612	ГЕТ/9	c.435T>G	p.Asn145Lys	9
		–	chr17: 45,219,329	ГЕТ/16 ГОМ/2	c.1459T>G	p.Cys487Gly	18
		rs77891297	chr17: 45,216,169	ГЕТ/29 ГОМ/20	c.1658A>C	p.Gln553Pro	49
		rs79201963	chr17: 45,219,239	ГЕТ/39 ГОМ/10	c.1549G>A	p.Glu517Lys	49
		–	chr17: 45,247,301	ГЕТ/43 ГОМ/6	c.359T>C	p.Leu120Ser	49
		rs76836152	chr17: 45,216,172	ГЕТ/29 ГОМ/20	c.1655T>C	p.Leu552Pro	49
		rs62075657	chr17: 45,216,132	ГЕТ/40 ГОМ/9	c.1695A>C	p.Leu565Phe	49
		–	chr17: 45,214,614	ГЕТ/2	c.1835T>C	p.Leu612Pro	2
		rs186452221	chr17: 45,232,043	ГЕТ/18	c.952A>G	p.Lys318Glu	18
		rs62075620	chr17: 45,214,669	ГЕТ/42 ГОМ/4	c.1780A>C	p.Lys594Gln	46
		rs62077276	chr17: 45,258,954	ГЕТ/30 ГОМ/19	c.77T>C	p.Phe26Ser	49
		rs79487913	chr17: 45,219,296	ГЕТ/46 ГОМ/3	c.1492C>G	p.Pro498Ala	49
		rs77467652	chr17: 45,235,598	ГЕТ/4	c.449C>G	p.Ser150Cys	4
		rs76995821	chr17: 45,219,283	ГЕТ/1	c.1504_1505delTAinsCG	p.Tyr502Arg	1
		rs76995821	chr17: 45,219,283	ГЕТ/45 ГОМ/3	c.1505A>G	p.Tyr502Cys	48
		rs75729335	chr17: 45,219,226	ГЕТ/45 ГОМ/3	c.1562A>C	p.Tyr521Ser	48
rs112848754	chr17: 45,234,406	ГЕТ/2	c.714delT	p.Val239fs	2		
<i>CTBP2</i>	NM_022802	–	chr10: 126,686,634	ГЕТ/1	c.2084C>A	p.Ala695Glu	1
		rs61870306	chr10: 126,683,071	ГЕТ/48 ГОМ/1	c.2367C>G	p.Asn789Lys	49
		–	chr10: 126,683,058	ГЕТ/6	c.2380A>C	p.Asn794His	6
		rs80025996	chr10: 126,683,146	ГЕТ/23	c.2292G>T	p.Gln764His	23
		rs80273852	chr10: 126,683,075	ГЕТ/40 ГОМ/1	c.2363A>T	p.His788Leu	41
		rs76582415	chr10: 126,682,443	ГЕТ/33	c.2512C>A	p.His838Asn	33
		rs150320719	chr10: 126,683,132	ГЕТ/17	c.2306T>A	p.Leu769Gln	17
		rs79936509	chr10: 126,683,123	ГЕТ/48 ГОМ/1	c.2315T>G	p.Leu772Trp	49
		–	chr10: 126,714,721	ГЕТ/1	c.1605_1606delCT	p.Ser536fs	1
		rs146097043	chr10: 126,678,133	ГЕТ/6	c.2911delC	p.Gln971fs	6

**Окончание таблицы**

Ген	Транскрипт	Идентификатор мутации	Позиция на хромосоме	Генотип/ число образцов	Мутация кДНК	Аминокислота	Число образцов с мутацией
<i>HYDIN</i>	NM_001270974	rs116739010	chr16: 70,989,335	GET/45	c.6259C>T	p.Arg2087Cys	45
		rs1774360	chr16: 70,972,620	GET/42	c.6892C>G	p.Arg2298Gly	42
		rs117626004	chr16: 71,098,649	GET/43	c.2170A>G	p.Asn724Asp	43
		rs201356436	chr16: 70,896,033	GET/5	c.11695G>A	p.Val3899Met	5
		rs77276171	chr16: 70,896,015	GET/43	c.11712delT	p.Gln3905fs	43
<i>KMT5A</i>	NM_020382	rs77198130	chr12: 123,880,923	GET/3	c.542_543delTT	p.Leu181fs	3

Примечание. Представленные мутации выбраны согласно самым высоким значениям, предсказывающим их патогенность, одновременно по четырем алгоритмам: SIFT –  $\leq 0.05$  (патогенная), PolyPhen-2 –  $\geq 0.85$  (вероятно патогенная), MutationTaster – 1 (патогенная), LRT – D (disease, патогенная) или U (unknown, неизвестная). Серым фоном выделены потенциально патогенные мутации, остальные мутации – герминальные. Результаты получены на основании сравнения данных секвенирования экзомов образцов опухолей, а также трех образцов крови.

2018). При этом только в четырех генах (*CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*) идентифицированы потенциально патогенные мутации согласно нескольким предсказательным алгоритмам.

Для всех четырех выявленных генов ранее показана вовлеченность в образование опухолей. Ген *CDC27* кодирует белок цикла клеточного деления 27. Этот белок является коровой субъединицей комплекса стимуляции анафазы/циклосомы (APC/C), который катализирует реакцию убиквитинирования и регулирует деградацию белков в ходе митоза (Page, Nietzer, 1999; Peters, 2006). Мутации в гене *CDC27* обнаружены при остеосаркоме, раке яичка, предстательной железы и колоректальном раке (Lindberg et al., 2013; Reimann et al., 2014; Yu et al., 2014; Litchfield et al., 2015). Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене *CDC27*, а также снижение его экспрессии связаны с риском развития рака молочной железы (Stevens et al., 2011). При раке молочной железы уровень экспрессии *CDC27* и секурина, а также соотношение уровней экспрессии этих двух белков могут быть использованы для оценки прогноза заболевания (Talvinen et al., 2013). На клеточных линиях рака молочной железы показано участие *CDC27* в полиубиквитинировании циклина D1 (Pawar et al., 2010). Циклин D1 является протоонкогеном, регулирующим фазовый переход G1-S клеточного цикла в опухолевых клетках (Alao, 2007); повышение его экспрессии наблюдается при многих видах рака (Juhlin et al., 2009). В клеточных линиях колоректального рака подавление экспрессии *CDC27* приводило к ингибированию пролиферации опухолевых клеток, в то время как повышение экспрессии – к стимуляции клеточного деления (Qiu et al., 2016).

Ген *CTBP2* кодирует С-концевой связывающий белок 2. Вместе со своим паралогом, *CTBP2*, белки участвуют в регуляции транскрипции путем связывания с ДНК или факторами ремоделирования хроматина, например метилтрансферазами гистонов (HMTs) или деацетилазами гистонов (HDACs) (Turner, Crossley, 2001). На клеточных

линиях рака молочной железы показано влияние *CTBP1/2* на репарацию ДНК (Di et al., 2010, 2013). В опухолевых клетках *CTBP2* участвует в активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и метастазировании (Di et al., 2013; Zhang J. et al., 2015). Повышение экспрессии *CTBP2* наблюдается при раке молочной железы, предстательной железы, яичников, желудка, глиомах и ассоциировано с плохим прогнозом и снижением выживаемости больных (Barroilhet et al., 2013; Di et al., 2013; Zhang et al., 2014; Wang et al., 2016; Dai et al., 2017).

Ген *HYDIN* кодирует протяженный белок, предположительно участвующий в клеточном движении (Davy, Robinson, 2003; Doggett et al., 2006). В гене *HYDIN* обнаружены частые соматические мутации у больных раком молочной железы (Zhang Y. et al., 2015). Сравнительное исследование мутаций в генах среди 23 разных видов рака, выполненное с использованием базы данных COSMIC (v68), показало, что *HYDIN* входит в число первых ста генов с наибольшей частотой мутаций (Tan et al., 2015).

Ген *KMT5A* (*SET8*, *SETD8* или *PR-Set7*) кодирует метилтрансферазу гистонов 5A, которая обеспечивает метилирование лизина 20 гистона H4 и участвует в транскрипционной репрессии ряда генов (Nishioka et al., 2002). Важные функции *KMT5A* – поддержание структуры ДНК во время митоза, конденсация хроматина и обеспечение нормального прохождения цитокинеза (Wu, Rice, 2011; Beck et al., 2012). В ряде исследований показана вовлеченность гена *KMT5A* в разные патологические процессы, в том числе канцерогенез (Yu et al., 2013; Milite et al., 2016). *KMT5A* может влиять на транскрипционную активность p53 и его основные функции (проапоптотическую, а также арест клеточного цикла) путем метилирования лизина 382 (p53K382) (Shi et al., 2007). Повышение экспрессии гена *KMT5A* наблюдается при глиоме, хронической миелоидной лейкемии, гепатоцеллюлярной карциноме, раке поджелудочной железы, щитовидной железы и легкого (Takawa et al., 2012; Liao et al., 2018; Ma, 2018). При раке мо-

лочной железы повышенная экспрессия *KMT5A* положительно коррелирует с экспрессией *TWIST* и N-кадгерина и отрицательно коррелирует с экспрессией E-кадгерина, что свидетельствует о его вовлеченности в ЭМП (Yang et al., 2012). Способность *KMT5A* увеличивать инвазивный потенциал опухолевых клеток подтверждается несколькими исследованиями (Yu et al., 2013; Liao et al., 2018). Полиморфизм в гене *KMT5A* (rs16917496), располагающийся в 3'-негтранслируемой области (3'-UTR) в сайте связывания с микроРНК miR-502, – один из двенадцати полиморфизмов с aberrантной частотой аллелей в опухолях (по данным анализа библиотек EST NCBI), обнаруженных в сайтах связывания микроРНК с мРНК. Эти SNP могут нарушать связывание микроРНК с мРНК-мишенью и влиять на экспрессию белка (Yu et al., 2007). Данный полиморфизм ассоциирован со снижением экспрессии гена *KMT5A* и увеличением общей выживаемости больных гепатоцеллюлярной карциномой, раком молочной железы, яичников и легкого (Song et al., 2009; Ding et al., 2012; Guo et al., 2012; Wang et al., 2012; Xu et al., 2013).

Идентифицированные гены кодируют преимущественно консервативные белки и участвуют в важных клеточных процессах, таких как пролиферация, регуляция транскрипции, клеточный цикл, эпигенетическая регуляция экспрессии генов и движение клеток. Все четыре гена, согласно данным литературы, вовлечены в канцерогенез и ассоциированы с опухолями различных локализаций. Для генов *CDC27* и *CTBP2* показана функция потенциального гена-супрессора опухолевого роста и онкогена соответственно. Однако при детальном рассмотрении выявленных мутаций в этих генах обнаружены варианты, характерные для большинства образцов выборки каротидных параганглиом (например, в 49 случаях из 52). Причем часть мутаций встречается в гомозиготном состоянии, исходя из чего сделано предположение, что данные мутации являются герминальными вариантами. Это было подтверждено после секвенирования экзона крови трех пациентов с использованием набора для пробоподготовки библиотек, аналогичного набору, который был использован для подготовки экзомных библиотек из опухолевой ткани. Обнаружено, что большинство идентифицированных мутаций наследственные. Часть остальных потенциально соматических мутаций встречается более чем в одном образце КПП. Возможно, эти мутации также окажутся герминальными при анализе экзона парной нормальной ткани, полученной от этих же пациентов, или большего числа образцов нормальной ткани. Однако эти мутации могут быть действительно ассоциированы с патогенезом каротидных параганглиом, так как для других видов опухолей показано участие выявленных нами генов в канцерогенезе, в частности, вследствие появления онко-ассоциированных мутаций. Маловероятно, что обнаруженные мутации являются следствием ошибок секвенирования.

Таким образом, инструменты и алгоритмы, используемые для анализа частоты мутаций, имеют определенные недостатки. В базах данных 1000 Genomes Project и ExAC могут быть ошибки аннотации. Гены, располагающиеся в недостаточно хорошо аннотированных областях генома, по-видимому, ошибочно попадают в список генов с высо-

кой частотой мутаций. На получаемых результатах могут также сказаться недостаточное покрытие при секвенировании определенных генов или ошибки секвенирования. Поэтому необходимо совершенствовать методики для выявления онко-ассоциированных генов и патогенных мутаций. По-видимому, выявленные нами несколько областей с ошибочной аннотацией в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC несущественно влияют на средний уровень МН, рассчитанный для КПП. Необычная форма графика при анализе каротидных параганглиом оказалась артефактом, и при этом типе опухолей гены различаются по частоте мутаций незначительно. Однако ряд идентифицированных мутаций в генах *CDC27*, *CTBP2*, *HYDIN* и *KMT5A*, которые предсказаны как предположительно патогенные, а также большое количество данных об их вовлеченности в формирование и прогрессию других типов опухолей позволяют считать эти гены потенциально связанными с патогенезом КПП и требуют обратить на них особое внимание в дальнейших исследованиях.

### Благодарности

Авторы благодарят Институт хирургии им. А.В. Вишневского за помощь в создании коллекции образцов, Национальный медицинский исследовательский центр радиологии и Российский университет дружбы народов за помощь в обработке данных, ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта ([http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu\\_genome\\_c.php](http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php)) за использование приборной базы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 17-75-20105.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

- Alao J.P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol. Cancer*. 2007;6:24. DOI 10.1186/1476-4598-6-24.
- Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Borresen-Dale A.L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörð J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilicic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otín C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlessner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421. DOI 10.1038/nature12477.
- Barroilhet L., Yang J., Hasselblatt K., Paranal R.M., Ng S.K., Rauh-Hain J.A., Welch W.R., Bradner J.E., Berkowitz R.S., Ng S.W. C-terminal binding protein-2 regulates response of epithelial ovarian cancer cells to histone deacetylase inhibitors. *Oncogene*. 2013; 32(33):3896-3903. DOI 10.1038/onc.2012.380.

- Beck D.B., Oda H., Shen S.S., Reinberg D. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev.* 2012;26(4):325-337. DOI 10.1101/gad.177444.111.
- Bracarda S., Altavilla A., Hamzaj A., Sisani M., Marrocolo F., Del Buono S., Danielli R. Immunologic checkpoints blockade in renal cell, prostate, and urothelial malignancies. *Semin. Oncol.* 2015;42(3):495-505. DOI 10.1053/j.semincol.2015.02.004.
- Chabanon R.M., Pedrero M., Lefebvre C., Marabelle A., Soria J.C., Postel-Vinay S. Mutational landscape and sensitivity to immune checkpoint blockers. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(17):4309-4321. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-16-0903.
- Dai F., Xuan Y., Jin J.J., Yu S., Long Z.W., Cai H., Liu X.W., Zhou Y., Wang Y.N., Chen Z., Huang H. CtBP2 overexpression promotes tumor cell proliferation and invasion in gastric cancer and is associated with poor prognosis. *Oncotarget.* 2017;8(17):28736-28749. DOI 10.18632/oncotarget.15661.
- Davy B.E., Robinson M.L. Congenital hydrocephalus in *hy3* mice is caused by a frameshift mutation in *Hydin*, a large novel gene. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12(10):1163-1170. DOI 10.1093/hmg/ddg122.
- Di L.J., Byun J.S., Wong M.M., Wakano C., Taylor T., Bilke S., Baek S., Hunter K., Yang H., Lee M., Zvosec C., Khrantsova G., Cheng F., Perou C.M., Miller C.R., Raab R., Olopade O.I., Gardner K. Genome-wide profiles of CtBP link metabolism with genome stability and epithelial reprogramming in breast cancer. *Nat. Commun.* 2013;4:1449. DOI 10.1038/ncomms2438.
- Di L.J., Fernandez A.G., De Siervi A., Longo D.L., Gardner K. Transcriptional regulation of *BRCA1* expression by a metabolic switch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010;17(12):1406-1413. DOI 10.1038/nsmb.1941.
- Ding C., Li R., Peng J., Li S., Guo Z. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the *SET8* gene is associated with the outcome of small-cell lung cancer. *Exp. Ther. Med.* 2012;3(4):689-692. DOI 10.3892/etm.2012.469.
- Doggett N.A., Xie G., Meincke L.J., Sutherland R.D., Mundt M.O., Berbari N.S., Davy B.E., Robinson M.L., Rudd M.K., Weber J.L., Stallings R.L., Han C. A 360-kb interchromosomal duplication of the human *HYDIN* locus. *Genomics.* 2006;88(6):762-771. DOI 10.1016/j.ygeno.2006.07.012.
- Favier J., Amar L., Gimenez-Roqueplo A.P. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015;11(2):101-111. DOI 10.1038/nrendo.2014.188.
- Favier J., Gimenez-Roqueplo A.P. Genetics of paragangliomas and pheochromocytomas. *Med. Sci. (Paris).* 2012;28(6-7):625-632. DOI 10.1051/medsci/2012286016.
- Guo Z., Wu C., Wang X., Wang C., Zhang R., Shan B. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3'-untranslated region of the histone methyltransferase *SET8* is associated with hepatocellular carcinoma outcome. *Int. J. Cancer.* 2012;131(6):1318-1322. DOI 10.1002/ijc.27352.
- Juhlin C.C., Goh G., Healy J.M., Fonseca A.L., Scholl U.I., Stenman A., Kunstman J.W., Brown T.C., Overton J.D., Mane S.M., Nelson-Williams C., Bäckdahl M., Suttorp A.C., Haase M., Choi M., Schlessinger J., Rimm D.L., Höög A., Prasad M.L., Korah R., Kim J.K., Diehl J.A. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J. Cell Physiol.* 2009;220(2):292-296. DOI 10.1002/jcp.21791.
- Liao T., Wang Y.J., Hu J.Q., Wang Y., Han L.T., Ma B., Shi R.L., Qu N., Wei W.J., Guan Q., Xiang J., Chen J.Y., Sun G.H., Li D.S., Mu X.M., Ji Q.H. Histone methyltransferase *KMT5A* gene modulates oncogenesis and lipid metabolism of papillary thyroid cancer *in vitro*. *Oncol. Rep.* 2018;39(5):2185-2192. DOI 10.3892/or.2018.6295.
- Lindberg J., Mills I.G., Klevebring D., Liu W., Neiman M., Xu J., Wikström P., Wiklund P., Wiklund F., Egevad L., Grönberg H. The mitochondrial and autosomal mutation landscapes of prostate cancer. *Eur. Urol.* 2013;63(4):702-708. DOI 10.1016/j.eururo.2012.11.053.
- Litchfield K., Summersgill B., Yost S., Sultana R., Labreche K., Dudakia D., Renwick A., Seal S., Al-Saadi R., Broderick P., Turner N.C., Houlston R.S., Huddart R., Shipley J., Turnbull C. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat. Commun.* 2015;6:5973. DOI 10.1038/ncomms6973.
- Ma Z. Downregulation of SETD8 by miR-382 is involved in glioma progression. *Pathol. Res. Pract.* 2018;214(3):356-360. DOI 10.1016/j.prp.2018.01.004.
- Milite C., Feoli A., Viviano M., Rescigno D., Cianciulli A., Balzano A.L., Mai A., Castellano S., Sbardella G. The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clin. Epigenetics.* 2016;8:102. DOI 10.1186/s13148-016-0268-4.
- Nishioka K., Rice J.C., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Werner J., Wang Y., Chuikov S., Valenzuela P., Tempst P., Steward R., Lis J.T., Allis C.D., Reinberg D. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell.* 2002;9(6):1201-1213. DOI 10.1016/S1097-2765(02)00548-8.
- Nölting S., Grossman A.B. Signaling pathways in pheochromocytomas and paragangliomas: prospects for future therapies. *Endocr. Pathol.* 2012;23(1):21-33. DOI 10.1007/s12022-012-9199-6.
- Page A.M., Hieter P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:583-609. DOI 10.1146/annurev.biochem.68.1.583.
- Pawar S.A., Sarkar T.R., Balamurugan K., Sharan S., Wang J., Zhang Y., Dowdy S.F., Huang A.M., Sterneck E. C/EBP $\delta$  targets cyclin D1 for proteasome-mediated degradation via induction of CDC27/APC3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(20):9210-9215. DOI 10.1073/pnas.0913813107.
- Peters J.M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7(9):644-656. DOI 10.1038/nrm1988.
- Plouin P.F., Amar L., Dekkers O.M., Fassnacht M., Gimenez-Roqueplo A.P., Lenders J.W., Lusse-Lepoutre C., Steichen O. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a pheochromocytoma or a paraganglioma. *Eur. J. Endocrinol.* 2016;174(5):G1-G10. DOI 10.1530/EJE-16-0033.
- Qiu L., Wu J., Pan C., Tan X., Lin J., Liu R., Chen S., Geng R., Huang W. Downregulation of CDC27 inhibits the proliferation of colorectal cancer cells via the accumulation of p21<sup>Cip1/Waf1</sup>. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2074. DOI 10.1038/cddis.2015.402.
- Reimann E., Köks S., Ho X.D., Maasalu K., Märtson A. Whole exome sequencing of a single osteosarcoma case—integrative analysis with whole transcriptome RNA-seq data. *Hum. Genomics.* 2014;8:20. DOI 10.1186/s40246-014-0020-0.
- Shi X., Kachirskaja I., Yamaguchi H., West L.E., Wen H., Wang E.W., Dutta S., Appella E., Gozani O. Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol. Cell.* 2007;27(4):636-646. DOI 10.1016/j.molcel.2007.07.012.
- Snezhkina A.V., Lukyanova E.N., Kalinin D.V., Pokrovsky A.V., Dmitriev A.A., Koroban N.V., Pudova E.A., Fedorova M.S., Volchenko N.N., Stepanov O.A., Zheveliyuk E.A., Kharitonov S.L., Lipatova A.V., Abramov I.S., Golovyuk A.V., Yegorov Y.E., Vishnyakova K.S., Moskalev A.A., Krasnov G.S., Melnikova N.V., Shcherbo D.S., Kiseleva M.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Y., Zaretsky A.R., Kudryavtseva A.V. Exome analysis of carotid body tumor. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(Suppl.1):17. DOI 10.1186/s12920-018-0327-0.
- Song F., Zheng H., Liu B., Wei S., Dai H., Zhang L., Calin G.A., Hao X., Wei Q., Zhang W., Chen K. An miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the *SET8* gene is associated with early age of breast cancer onset. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(19):6292-6300. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-0826.
- Stevens K.N., Wang X., Fredericksen Z., Pankratz V.S., Cerhan J., Vachon C.M., Olson J.E., Couch F.J. Evaluation of associations between common variation in mitotic regulatory pathways and risk of overall and high grade breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011;129(2):617-622. DOI 10.1007/s10549-011-1587-y.
- Takawa M., Cho H.S., Hayami S., Toyokawa G., Kogure M., Yamane Y., Iwai Y., Maejima K., Ueda K., Masuda A., Dohmae N.,

- Field H.I., Tsunoda T., Kobayashi T., Akasu T., Sugiyama M., Ohnuma S., Atomi Y., Ponder B.A., Nakamura Y., Hamamoto R. Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res.* 2012;72(13):3217-3227. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-3701.
- Talvinen K., Karra H., Pitkänen R., Ahonen I., Nykänen M., Lintunen M., Söderström M., Kuopio T., Kronqvist P. Low *cdc27* and high *securin* expression predict short survival for breast cancer patients. *APMIS.* 2013;121(10):945-953. DOI 10.1111/apm.12110.
- Tan H., Bao J., Zhou X. Genome-wide mutational spectra analysis reveals significant cancer-specific heterogeneity. *Sci. Rep.* 2015;5:12566. DOI 10.1038/srep12566.
- Topalian S.L., Taube J.M., Anders R.A., Pardoll D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2016;16(5):275-287. DOI 10.1038/nrc.2016.36.
- Turner J., Crossley M. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays.* 2001;23(8):683-690. DOI 10.1002/bies.1097.
- Unlü Y., Becit N., Ceviz M., Koçak H. Management of carotid body tumors and familial paragangliomas: review of 30 years' experience. *Ann. Vasc. Surg.* 2009;23(5):616-620. DOI 10.1016/j.avsg.2009.06.014.
- Van Allen E.M., Miao D., Schilling B., Shukla S.A., Blank C., Zimmer L., Sucker A., Hillen U., Foppen M.H.G., Goldinger S.M., Utikal J., Hassel J.C., Weide B., Kaehler K.C., Loquai C., Mohr P., Gutzmer R., Dummer R., Gabriel S., Wu C.J., Schadendorf D., Garraway L.A. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science.* 2015;350(6257):207-211. DOI 10.1126/science.aad0095.
- Wang C., Guo Z., Wu C., Li Y., Kang S. A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the *SET8* gene is associated with the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Genet.* 2012;205(7-8):373-376. DOI 10.1016/j.cancergen.2012.04.010.
- Wang Y., Che S., Cai G., He Y., Chen J., Xu W. Expression and prognostic significance of CTBP2 in human gliomas. *Oncol. Lett.* 2016;12(4):2429-2434. DOI 10.3892/ol.2016.4998.
- Wu S., Rice J.C. A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell Cycle.* 2011;10(1):68-72. DOI 10.4161/cc.10.1.14363.
- Xu J., Yin Z., Gao W., Liu L., Yin Y., Liu P., Shu Y. Genetic variation in a microRNA-502 binding site in *SET8* gene confers clinical outcome of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *PLoS One.* 2013;8(10):e77024. DOI 10.1371/journal.pone.0077024.
- Yang F., Sun L., Li Q., Han X., Lei L., Zhang H., Shang Y. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* 2012;31(1):110-123. DOI 10.1038/emboj.2011.364.
- Yu C., Yu J., Yao X., Wu W.K., Lu Y., Tang S., Li X., Bao L., Li X., Hou Y., Wu R., Jian M., Chen R., Zhang F., Xu L., Fan F., He J., Liang Q., Wang H., Hu X., He M., Zhang X., Zheng H., Li Q., Wu H., Chen Y., Yang X., Zhu S., Xu X., Yang H., Wang J., Zhang X., Sung J.J., Li Y., Wang J. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene *SLC12A5* in colon cancer by single-cell sequencing. *Cell Res.* 2014;24(6):701-712. DOI 10.1038/cr.2014.43.
- Yu N., Huangyang P., Yang X., Han X., Yan R., Jia H., Shang Y., Sun L. microRNA-7 suppresses the invasive potential of breast cancer cells and sensitizes cells to DNA damages by targeting histone methyltransferase SET8. *J. Biol. Chem.* 2013;288(27):19633-19642. DOI 10.1074/jbc.M113.475657.
- Yu Z., Li Z., Jolicoeur N., Zhang L., Fortin Y., Wang E., Wu M., Shen S.H. Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(13):4535-4541. DOI 10.1093/nar/gkm480.
- Zhang C., Gao C., Xu Y., Zhang Z. *CtBP2* could promote prostate cancer cell proliferation through c-Myc signaling. *Gene.* 2014;546(1):73-79. DOI 10.1016/j.gene.2014.05.032.
- Zhang J., Zhu J., Yang L., Guan C., Ni R., Wang Y., Ji L., Tian Y. Interaction with CCNH/CDK7 facilitates CtBP2 promoting esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) metastasis via upregulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) progression. *Tumour Biol.* 2015;36(9):6701-6714. DOI 10.1007/s13277-015-3354-x.
- Zhang Y., Cai Q., Shu X.O., Gao Y.T., Li C., Zheng W., Long J. Whole-exome sequencing identifies novel somatic mutations in Chinese breast cancer patients. *J. Mol. Genet. Med.* 2015;9(4):183. DOI 10.4172/1747-0862.1000183.
- Zhikrivetskaya S.O., Snezhkina A.V., Zaretsky A.R., Alekseev B.Y., Pokrovsky A.V., Golovyuk A.L., Melnikova N.V., Stepanov O.A., Kalinin D.V., Moskalev A.A., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V. Molecular markers of paragangliomas/pheochromocytomas. *Oncotarget.* 2017;8(15):25756-25782. DOI 10.18632/oncotarget.15201.

#### ORCID ID

E.N. Lukyanova [orcid.org/0000-0003-3566-5873](https://orcid.org/0000-0003-3566-5873)  
A.V. Snezhkina [orcid.org/0000-0002-4421-4364](https://orcid.org/0000-0002-4421-4364)  
D.V. Kalinin [orcid.org/0000-0001-6237-9481](https://orcid.org/0000-0001-6237-9481)  
A.V. Pokrovsky [orcid.org/0000-0003-0366-3750](https://orcid.org/0000-0003-0366-3750)  
A.L. Golovyuk [orcid.org/0000-0001-6830-7832](https://orcid.org/0000-0001-6830-7832)  
O.A. Stepanov [orcid.org/0000-0001-6129-6499](https://orcid.org/0000-0001-6129-6499)  
E.A. Pudova [orcid.org/0000-0002-5492-1361](https://orcid.org/0000-0002-5492-1361)  
G.S. Razmakhaev [orcid.org/0000-0002-3979-8940](https://orcid.org/0000-0002-3979-8940)  
M.V. Orlova [orcid.org/0000-0002-8213-4461](https://orcid.org/0000-0002-8213-4461)  
A.P. Polyakov [orcid.org/0000-0003-2095-5931](https://orcid.org/0000-0003-2095-5931)  
M.V. Kiseleva [orcid.org/0000-0001-8464-1726](https://orcid.org/0000-0001-8464-1726)  
A.D. Kaprin [orcid.org/0000-0001-8784-8415](https://orcid.org/0000-0001-8784-8415)  
A.V. Kudryavtseva [orcid.org/0000-0002-3722-8207](https://orcid.org/0000-0002-3722-8207)

# Генетическая изменчивость бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота, оцененная на основе анализа полиморфизма генов *GH1*, *GHR* и *PRL*

И.В. Лазебная<sup>1</sup>, А.В. Перчун<sup>2</sup>, Б.Б. Лхасаранов<sup>3</sup>, О.Е. Лазебный<sup>4</sup>, Ю.А. Столповский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

<sup>3</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Шулуута», Республика Бурятия, Улан-Удэ, Россия

<sup>4</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

Малочисленные уникальные бурятская и алтайская породы крупного рогатого скота турано-монгольского корня хорошо адаптированы к суровым условиям континентального климата региона обитания. Информация о популяционно-генетической структуре этих пород практически отсутствует. В настоящей работе выполнен анализ генетической изменчивости следующих генов-кандидатов: *GH1* (AC\_000176.1: хромосома 19, экзон 5, rs41923484, g.2141C>G, L127V), *GHR* (AC\_000177.1: хромосома 20, экзон 10, rs109300983, g.257A>G, S555G), *PRL* (AC\_000180.1: хромосома 23, экзон 3, g.35108342A>G) в выборках бурятской породы из трех сопредельных государств – России, Китая и Монголии, а также аборигенной алтайской породы (Россия), относящихся в соответствии с происхождением к турано-монгольскому корню. Российская выборка бурятского скота дифференцируется от монгольской выборки этой породы на основе попарных значений  $G$ -теста и  $F_{ST}$  по изменчивости *RsaI*-локуса гена *PRL* и от китайской выборки – на основе значений  $G$ -теста для *AluI*-локуса гена *GH1*. При этом все выборки бурятского скота ведут себя согласованно в отношении алтайской породы, четко отличаясь от нее по данным  $G$ -теста и  $F_{ST}$  для локуса гена *GHR* и по значениям  $F_{ST}$  для комплекса локусов генов *PRL*, *GH1* и *GHR*. Генетические расстояния Нея на основе комплекса генов также отделяют бурятскую и алтайскую породу. Наибольший вклад в межпородную дифференциацию двух пород вносит изменчивость гена *GHR*, что зафиксировано в результатах AMOVA (16 %) и  $F_{ST}$  (0.12–0.27). Кластерный анализ, выполненный в программе STRUCTURE, выявил четыре кластера в алтайской породе крупного рогатого скота, китайской и монгольской выборках бурятского скота, которые представлены специфично в каждой выборке. У российского бурятского скота отсутствует один кластер, его частота в других выборках достигает 15 %. Различия на внутривидовом уровне у бурятской породы определяют локусы генов *PRL* и *GH1*, на межпородном с алтайской породой – исследованный локус гена *GHR*, что отражает неодинаковый вклад разных локусов. Анализ на неравновесие по сцеплению генов доказал достоверное сцепление следующих пар генов у бурятской породы: *GH1-GHR*, *GH1-PRL*, *GHR-PRL*.

Ключевые слова: *Bos taurus turano-mongolicus*; бурятский крупный рогатый скот; алтайский крупный рогатый скот; популяционная генетика; полиморфизм генов; *GH1*; *PRL*; *GHR*.

## Analysis of *GH1*, *GHR* and *PRL* gene polymorphisms for estimation of the genetic diversity of Buryat and Altai cattle breeds

I.V. Lazebnaya<sup>1</sup>, A.V. Perchun<sup>2</sup>, B.B. Lhasaranov<sup>3</sup>, O.E. Lazebny<sup>4</sup>, Yu.A. Stolpovskiy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia

<sup>3</sup> Ltd Shuluuta, Buryatia, Ulan-Ude, Russia

<sup>4</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow, Russia

Small and unique Buryat and Altai cattle breeds of Turano-Mongolian origin are well adapted to harsh conditions of the continental climate to be their habitat. However, the population-genetic structure of the breeds has been poorly studied. This paper presents the results of analysis of polymorphisms *GH1* (AC\_000176.1: BTA 19, exon 5, rs41923484, g.2141C>G, L127V), *GHR* (AC\_000177.1: BTA 20, exon 10, rs109300983, g.257A>G, S555G) and *PRL* (AC\_000180.1: BTA 23, exon 3, g.35108342A>G) in the samples of Buryat cattle breed of Russia, China and Mongolia, and indigenous Altai cattle breed (Russia) that belong to Turano-Mongolian cattle. The Russian sample of Buryat breed was differentiated from the Mongolian sample based on pairwise  $G$ -test and  $F_{ST}$  values for the *PRL-RsaI* polymorphism and from the Chinese sample – based on pairwise  $G$ -test values for the *GH1-AluI* polymorphism. All the three samples of Buryat breed clearly differed from the sample of Altai breed based on pairwise  $G$ -test and  $F_{ST}$  values for the *GHR-AluI* polymorphism as well as on the base of  $F_{ST}$  values for the joint polymorphism of the three genes. Nei's genetic distances calculated from the three gene polymorphisms also confirmed the difference between the two breeds. The results of AMOVA demonstrated that *GHR* gene variability (16 %) gave the largest contribution to the differentiation that was confirmed by  $F_{ST}$  values (0.12–0.27). The STRUCTURE software enabled us to reveal four clusters, with a specific ratio for each sample, in the Chinese and Mongolian samples of Buryat breed, and in the sample of Altai breed, while the Russian sample of Buryat breed had only three clusters. The differences within the breed level were determined based on the *GH1-AluI* and *PRL-RsaI* polymorphisms, while at the inter-breed level – based on the *GHR-AluI* polymorphism. Linkage

disequilibrium analysis demonstrated significant linkage of the following pairs of genes in the Buryat breed: *GH1-GHR*, *GH1-PRL*, *GHR-PRL*.

Key words: *Bos taurus turano-mongolicus*; Buryat cattle; Altai cattle; population genetics; gene polymorphism; *GH1*; *PRL*; *GHR*.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лазебная И.В., Перчун А.В., Лхасаранов Б.Б., Лазебный О.Е., Столповский Ю.А. Генетическая изменчивость бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота, оцененная на основе анализа полиморфизма генов *GH1*, *GHR* и *PRL*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lazebnaya I.V., Perchun A.V., Lhasaranov B.B., Lazebny O.E., Stolpovskiy Yu.A. Analysis of *GH1*, *GHR* and *PRL* gene polymorphisms for estimation of the genetic diversity of Buryat and Altai cattle breeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):734-741. DOI 10.18699/VJ18.417

Бурятский и алтайский крупный рогатый скот в отличие от большинства европейских пород, произошедших от европейского тура *Bos primigenius primigenius* (Hiendleder et al., 2008), имеет восточноазиатское происхождение и по краниологическим данным и строению рогов относится к подвиду *B. taurus turano-mongolicus* Kolesnik, 1936, включающему также киргизскую, якутскую, сибирскую, сойотскую, монгольскую и маньчжурскую породы (цит. по: Kantanen et al., 2009).

В настоящее время в России, наряду с бурятским и алтайским, сохранился калмыцкий и якутский крупный рогатый скот. Для данных пород характерны высокая приспособленность к суровым условиям континентального климата и особенностям региона обитания, физическая выносливость, минимальное участие человека в их содержании, круглогодичное пребывание на свободном выпасе и сохранение жизнеспособности при низкокалорийной и скудной кормовой базе в отдельные периоды года, способность переваривать грубые корма и находить их под снежным покровом. Этому способствуют физиологические и морфологические адаптации – от особенностей строения пищеварительной системы и обмена веществ до появления более длинной и густой шерсти в зимний период (Лазебная и др., 2010).

Бурятский и алтайский скот не обладает высокой молочной продуктивностью. По данным М.Н. Балкова (1962), молочная продуктивность за 305 дней лактации у 114 коров с учетом четырех и более отелов в среднем составила 911 кг с процентным содержанием жира 4.58. Однако неприхотливость животных, малозатратность их содержания и высокая устойчивость к заболеваниям позволяют считать их не только уникальными, но и незаменимыми породами в районах традиционного разведения для решения вопросов экологического питания и сохранения исторических традиций местного населения, технологий, связанных с приготовлением традиционной пищи, национальной одежды, для развития агро- и туризма. Кроме того, в мире не так много пород крупного рогатого скота с древнейшим происхождением, которые обладают перечисленными особенностями, что позволяет рассматривать их как важный объект научного изучения с возможностью использования генетического потенциала данных пород в настоящем и будущем (Dmitriev, Ernest, 1989; Уханов и др., 1993; Моисеева и др., 2006; Mwai et al., 2015; Shabtay, 2015).

Несмотря на все перечисленное, о генетических особенностях пород турано-монгольского корня известно

немного. У якутской и калмыцкой пород исследованы отдельные гены-кандидаты, SNP которых ассоциированы у крупного рогатого скота с селекционно-ценными признаками продуктивности (Лазебная и др., 2010; Lazebnaya et al., 2013; Горлов и др., 2014). С использованием полилокусных (ISSR) и монолокусных (SSR) ДНК-маркеров изучен спектр пород, включая якутскую, калмыцкую и монгольскую (Tario et al., 2010; Столповский и др., 2011). Недавно выполнен полногеномный SNP-анализ ряда российских пород, среди которых была и бурятская, с целью изучения происхождения, филогении и дифференциации (Yurchenko et al., 2017).

Изменчивость генов соматотропиновой оси, являющихся кандидатами на связь с признаками молочной и мясной продуктивности, хорошо изучена у отдельных коммерческих пород крупного рогатого скота. Установлена корреляция полиморфизма генов гормона роста (*GH1*), его рецептора (*GHR*) и пролактина (*PRL*) с ростом и развитием, скоростью набора веса и качеством мяса, белково- и жиромолочностью (Mitra et al., 1995; Chung et al., 1996; Chrenek et al., 1999; Dybus et al., 2004; Di Stasio et al., 2005). Наиболее известны следующие SNP перечисленных генов: *AluI*- генов *GH1* (L127V, экзон 5) (Dybus et al., 2004) и *GHR* (AF140284: g.257A>G, экзон 10, Ser/Gly) (Di Stasio et al., 2005), и *RsaI*- гена *PRL* (A>G, 103 кодон, экзон 3) (Mitra et al., 1995). Сравнительные данные об изменчивости перечисленных генов у бурятского и алтайского скота отсутствуют.

Целью настоящего исследования была оценка генетической структуры выборок двух пород турано-монгольского корня: бурятской породы из сопредельных территорий Китая, Монголии и России для выявления особенностей внутривидовой изменчивости и российского аборигенного алтайского крупного рогатого скота на основе анализа полиморфизма генов *PRL*, *GH1* и *GHR*.

#### Материал и методы

Исследовали кровь крупного рогатого скота бурятской породы из трех сопредельных государств: России (ООО «Шулуута»), Республика Бурятия,  $n = 51$ ), Северной Монголии (аймак Хубсугул,  $n = 25$ ) и Китая (Внутренняя Монголия,  $n = 13$ ), а также алтайского скота из России (село Язула Улаганского района Республики Алтай,  $n = 21$ ).

Анализ *AluI* полиморфизмов генов *GH1* (AC\_000176.1: хромосома 19, экзон 5, rs41923484, g.2141C>G, L127V) (Dybus et al., 2004) и *GHR* (AC\_000177.1: хромосома 20, экзон 10, rs109300983, g.257A>G, S555G) (Di Stasio et

al., 2005) и *RsaI* гена *PRL* (AC\_000180.1: хромосома 23, экзон 3, g.35108342A>G) (Lewin et al., 1992) у крупного рогатого скота проводили методом ПЦР-ПДРФ с использованием следующих наборов реагентов: D1Atom™ DNA Prep (IsoGene Lab., Москва, Россия) – для выделения ДНК из цельной крови, GenPak<sup>®</sup> PCR Core (IsoGene Lab., Москва, Россия) – для амплификации анализируемых участков генов, эндонуклеазы рестрикции фирмы Thermo Fisher Scientific (США): *AluI* – для *GH1* и *GHR* генов, *RsaI* – для гена *PRL* (Mitra et al., 1995; Dybus et al., 2004; Di Stasio et al., 2005; Hradecka et al., 2008).

Статистическая обработка данных выполнена с применением пакетов программ GenAlEx 6.503 ([http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download\\_files/GenAlEx%206.503%20Download.zip](http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download_files/GenAlEx%206.503%20Download.zip)) и STRUCTURE 2.3.4. ([https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/html/structure.html](https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html)). Для оценки достоверности значения  $p_{F_{st}}$ ,  $p_{G_{st}}$ ,  $p_{\chi^2}$  использовали поправку на множественные сравнения Бенжамини–Хочберга (Benjamini, Hochberg, 1995). Сцепление генов оценивали с использованием коэффициентов сцепления ( $D$ ) и корреляции ( $r$ ), достоверность неравновесия по сцеплению – с помощью критерия  $\chi^2$ , применяя поправку на множественные сравнения Бенжамини–Хочберга. Кластерный анализ генетической структуры на основе комплекса исследованных генов выполнен в программе STRUCTURE 2.3.4. При этом был проанализирован основной набор моделей, как с учетом генетического смешения (admixture), так и без смешения, и как с учетом корреляции частот аллелей, так и без него.

Анализ моделей проводился в двух режимах работы программы: без учета разбиения общей матрицы на исследуемые выборки и в режиме LOCPRIOR. В каждой из моделей тестировалось девять гипотез о популяционной структуре:  $K$  менялось от 1 до 9. Для каждого числа  $K$  моделирование повторялось 10 раз с целью сбора необходимой статистики по значениям и средней дисперсии логарифма значения функции правдоподобия. Тестирование числа возможных популяций производилось с помощью 1000000 итераций, с отбрасыванием (burn-in) первых 100000 итераций.

## Результаты

Для исследованных локусов генов *GH1*, *GHR* и *PRL* получены распределения частоты аллелей, а также результаты хи-квадрат теста со значениями вероятности для каждого из трех генов-кандидатов в рассматриваемых выборках крупного рогатого скота бурятской и алтайской пород (табл. 1). Согласно данным табл. 1, частота аллеля  $L$  гена *GH1* преобладает во всех выборках и варьирует от 0.654 у бурятской породы из Китая до 0.863 у российской выборки этой породы. Аллель  $A$  гена *PRL* также представлен с высокой частотой во всех выборках обеих пород, интервал значений частоты составляет от 0.620 у бурятской породы из Монголии до 0.814 у бурятской породы из России.

Распределение частоты аллелей гена *GHR* отличается от полученных для генов *GH1* и *PRL*: в выборке алтайской породы преобладает частота аллеля  $A$  – 0.881, а у бурятской породы из Монголии и России – частота аллеля  $G$ : 0.620 и 0.559 соответственно. Отметим, что во всех вы-

**Таблица 1.** Частота аллелей генов *GH1*, *GHR* и *PRL* и результаты теста Харди–Вайнберга в исследованных выборках бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота

Ген	Аллель	Алтайская, $n = 21$	Бурятская (Китай), $n = 13$	Бурятская (Монголия), $n = 25$	Бурятская (Россия), $n = 51$
<i>GH1</i>	$L$	0.857	0.654	0.800	0.863
	$V$	0.143	0.346	0.200	0.137
	$\chi^2$	0.583	0.294	0.000	1.510
	$p$	0.445	0.588	1.000	0.219
<i>GHR</i>	$A$	0.881	0.577	0.380	0.441
	$G$	0.119	0.423	0.620	0.559
	$\chi^2$	0.383	0.138	1.868	3.047
	$p$	0.536	0.710	0.172	0.081
<i>PRL</i>	$A$	0.690	0.731	0.620	0.814
	$B$	0.310	0.269	0.380	0.186
	$\chi^2$	1.018	0.007	0.110	0.045
	$p$	0.313	0.935	0.741	0.831

Примечание.  $n$  – объем выборки;  $\chi^2$  – значение критерия хи-квадрат;  $p$  – вероятность.

борках ни по одному из исследованных локусов генов *GH1*, *GHR* и *PRL* не выявлено отклонения наблюдаемого распределения частоты генотипов от ожидаемого по Харди–Вайнбергу.

Результаты попарного  $G$ -теста для рассматриваемых выборок и соответствующие им значения вероятности приведены в табл. 2. В соответствии с поправкой на множественные сравнения Бенжамини–Хочберга, значимыми являются значения вероятности, соответствующие условию  $p < 0.025$ . Таким образом, для бурятской породы выявлены отличия выборки из России от китайской и монгольской выборок соответственно по *AluI*-локусу гена *GH1* и по *RsaI*-локусу гена *PRL*. Обнаружено также отличие алтайской породы от выборок бурятской породы, независимо от их происхождения, по *AluI*-локусу гена *GHR*.

Дифференциация рассматриваемых выборок бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота оценена с использованием значения попарного коэффициента фиксации Райта ( $F_{ST}$ ) по отдельным генам и их комплексу (табл. 3). Достоверные значения  $F_{ST}$  с учетом поправки на множественные сравнения Бенжамини–Хочберга ( $p < 0.025$ ) установлены по рассматриваемому локусу гена *GHR* для пар выборок алтайской породы с выборками бурятской породы из Китая ( $F_{ST} = 0.117$ ), Монголии ( $F_{ST} = 0.269$ ) и России ( $F_{ST} = 0.216$ ). Эта закономерность сохраняется и в отношении значений данного параметра для комплекса генов. Кроме того, российская выборка бурятской породы отличается от монгольской выборки ( $F_{ST} = 0.046$ ) по исследованному локусу гена *PRL*.

Анализ табл. 3 показывает, что значимую дифференциацию алтайской породы от выборок бурятской породы из разных регионов определяет главным образом изменчивость гена *GHR*, на что указывает и результат AMOVA.

**Таблица 2.** Значения попарного G-теста и соответствующие им значения вероятности (*p*) для каждого генетического маркера

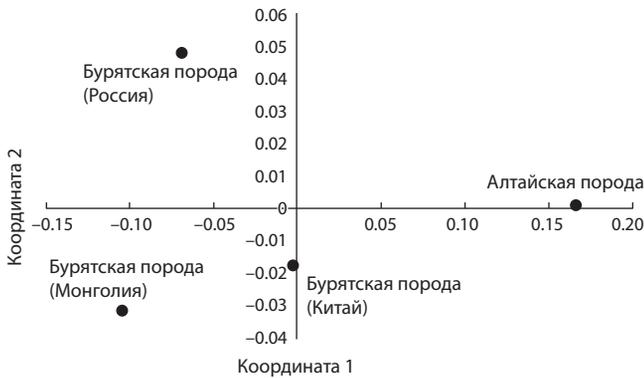
Порода (выборка)	Алтайская (Россия)	Бурятская (Китай)	Бурятская (Монголия)	Бурятская (Россия)
Ген <i>GH1</i>				
Алтайская (Россия)		0.052	0.469	1.000
Бурятская (Китай)	3.769		0.169	0.020
Бурятская (Монголия)	0.525	1.893		0.326
Бурятская (Россия)	0.000	5.424	0.964	
Ген <i>GHR</i>				
Алтайская (Россия)		0.004	0.000	0.000
Бурятская (Китай)	8.113		0.101	0.216
Бурятская (Монголия)	26.088	2.682		0.472
Бурятская (Россия)	26.191	1.533	0.518	
Ген <i>PRL</i>				
Алтайская (Россия)		0.722	0.479	0.114
Бурятская (Китай)	0.126		0.329	0.360
Бурятская (Монголия)	0.502	0.952		0.011
Бурятская (Россия)	2.505	0.836	6.465	

Примечание. Попарные значения G-теста для рассматриваемых выборок приведены ниже диагонали, соответствующие им значения вероятности *p* – выше диагонали.

**Таблица 3.** Попарная генетическая дифференциация выборок бурятской и алтайской пород на основе статистики Райта ( $F_{ST}$ ) и соответствующие им значения вероятности (*p*) отдельно по исследованным локусам генов *GH1*, *GHR* и *PRL* и по комплексу генов

Порода (выборка)	Алтайская (Россия)	Бурятская (Китай)	Бурятская (Монголия)	Бурятская (Россия)
Ген <i>GH1</i>				
Алтайская (Россия)		0.085	0.576	1.000
Бурятская (Китай)	0.056		0.292	0.051
Бурятская (Монголия)	0.006	0.027		0.393
Бурятская (Россия)	0.000	0.060	0.007	
Ген <i>GHR</i>				
Алтайская (Россия)		0.011	0.001	0.001
Бурятская (Китай)	0.117		0.123	0.312
Бурятская (Монголия)	0.269	0.039		0.493
Бурятская (Россия)	0.216	0.018	0.004	
Ген <i>PRL</i>				
Алтайская (Россия)		0.790	0.544	0.148
Бурятская (Китай)	0.002		0.449	0.427
Бурятская (Монголия)	0.005	0.014		0.024
Бурятская (Россия)	0.020	0.010	0.046	
Гены <i>GH1</i> , <i>GHR</i> и <i>PRL</i>				
Алтайская (Россия)		0.011	0.001	0.001
Бурятская (Китай)	0.058		0.130	0.118
Бурятская (Монголия)	0.108	0.027		0.075
Бурятская (Россия)	0.098	0.028	0.019	

Примечание. Попарные значения коэффициента  $F_{ST}$  рассматриваемых выборок приведены ниже диагонали, соответствующие им значения вероятности *p* – выше диагонали.



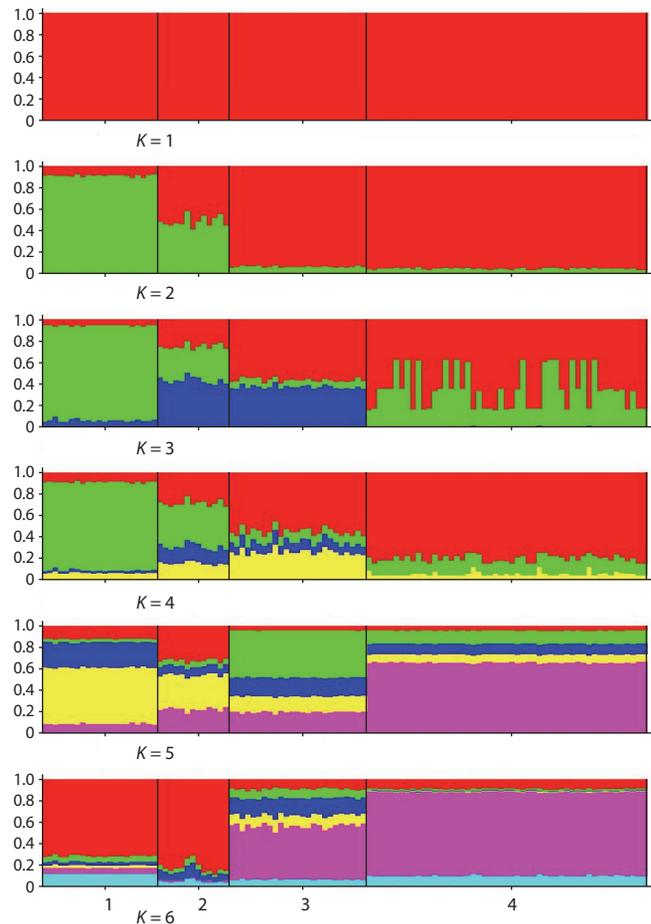
**Рис. 1.** Ординация исследованных выборок алтайской и бурятской пород в пространстве двух главных координат, построенная с использованием попарных генетических расстояний Нея (Nei, 1978).

Так, уровень межпопуляционной изменчивости по трем исследованным генам довольно высок и составляет 8 %, при этом для гена *GHR* – 16 %, тогда как для генов *GHI* и *PRL* – по 2 %. Ординация исследованных выборок в проекции двух первых главных координат, выполненная на основе попарного генетического расстояния Нея (Nei, 1978) по комплексу генов, представлена на рис. 1.

Доля изменчивости, приходящаяся на первую главную компоненту, составляет 92.33 %, на вторую – 7.67 %. Все исследованные выборки обеих пород дифференцируются друг от друга. Расстояние от алтайской породы до бурятской возрастает в ряду выборок: Китай, Россия и Монголия. При этом расчеты показывают, что среднее попарное расстояние Нея внутри группы, сформированной выборками бурятской породы из разных регионов ( $D_{Nei} = 0.071$ ), более чем в три раза меньше по сравнению со средним попарным расстоянием между алтайской породой и каждой выборкой бурятской породы из Китая, Монголии и России ( $D_{Nei} = 0.222$ ).

Кластерный анализ генетической структуры массива данных, включающего комплексные генотипы генов *GHI*, *GHR* и *PRL* в выборках бурятского скота из трех регионов и алтайской породы из России, выполнен в программе STRUCTURE. После тестирования различных моделей с учетом значений апостериорной вероятности была выбрана модель со смешением генетического материала, но без корреляции частот аллелей. Исходя из средних значений логарифма функции правдоподобия и дисперсии его оценок, полученных в десяти запусках программы с конкретным набором соответствующих параметров, оптимальное число кластеров ( $K$ ) оказалось равным четырем.

Каждая выборка имеет специфичное распределение кластеров (рис. 2, табл. 4). У большинства выборок обнаружены все типы кластеров, кроме бурятской породы из России, у которой один кластер (синего цвета на рис. 2 и обозначенный в табл. 4 под № 3) отсутствует, а частота его в других выборках не превышает 0.154. У бурятского крупного рогатого скота из Китая доля присутствия кластера 2, обозначенного зеленым цветом, высокая и составляет 0.403, выше доля этого кластера только у алтайской породы (0.820), у которой он значительно доминирует над остальными. Выборка бурятского скота из Китая ха-



**Рис. 2.** Анализ генетической структуры группы выборок бурятской и алтайской пород крупного рогатого скота на основе изменчивости генов *GHI*, *GHR* и *PRL* при значениях  $K$  от 1 до 6.

1 – алтайская порода; 2–4 – бурятская порода: 2 – из Китая, 3 – из Монголии, 4 – из России. Каждый тип структуры обозначен определенным цветом (см. пояснения в тексте).

рактеризуется наиболее равномерным распределением разных кластеров. Бурятский и алтайский скот из России отличаются значительным доминированием одного из кластеров, а именно кластеров 1 и 2 (см. табл. 4), обозначенных красным (0.800) и зеленым цветом соответственно.

У представителей *B. taurus* гены *GHI*, *GHR* и *PRL* локализованы на хромосомах 19, 20 и 23 соответственно, однако нельзя исключать сцепления отдельных локусов. Проведенный нами анализ попарного сцепления исследованных локусов трех генов в соответствии с поправкой Бенжамини–Хочберга показал достоверные значения вероятности ( $p < 0.025$ ) для локусов следующих пар генов: *GHI-GHR* у бурятской породы из России ( $D = 0.051$ ,  $r = 0.297$ ,  $p = 0.003$ ) и Монголии ( $D = 0.076$ ,  $r = 0.391$ ,  $p = 0.006$ ), для пары генов *GHI-PRL* у всех пар выборок бурятской породы ( $D = 0.033-0.099$ ,  $r = 0.248-0.470$ ,  $p = 0.012-0.020$ ) и для пары генов *GHR-PRL* – у бурятской из России ( $D = 0.063$ ,  $r = 0.324$ ,  $p = 0.001$ ). В табл. 5 приведены комплексные генотипы по двум и трем генам для выборок, в которых установлено сцепление генов по неравновесию. Согласно полученным частотам комплексных генотипов генов *GHI-PRL*, во всех выборках бурят-

**Таблица 4.** Доля выявленных кластеров в выборках алтайской и бурятской пород

Выборка	Объем выборки	Кластер			
		1	2	3	4
Алтайская	21	0.088	0.820	0.025	0.067
Бурятская (Китай)	13	0.286	0.403	0.154	0.157
Бурятская (Монголия)	25	0.551	0.093	0.095	0.260
Бурятская (Россия)	51	0.800	0.139	0.000	0.061

ского скота можно предположить сцепление *L*-аллеля гена *GHI* с *A*-аллелем гена *PRL*. Кроме того, в соответствии с максимальными частотами комплексных генотипов генов *GHI-GHR*, *L*-аллель гена *GHI* также сцеплен с *A*- и *G*-аллелями гена *GHR* у бурятского скота из России и Монголии. Эти закономерности отражены и в высоких частотах комплексных генотипов по трем генам, в которых представлены *L*-аллель гена *GHI*, *A*- и *G*-аллели гена *GHR*, *A*-аллель гена *PRL* у российской выборки бурятской породы крупного рогатого скота.

### Обсуждение

В проведенном исследовании впервые изучены выборки двух пород турано-монгольского корня: бурятской породы из Китая, Монголии и России в сравнении с алтайским скотом из России. Ни в одной из выборок не выявлено отклонения наблюдаемого распределения частот генотипов от ожидаемого по Харди–Вайнбергу. Российская выборка бурятского скота дифференцируется от монгольской выборки этой породы на основе попарных значений *G*-теста и  $F_{ST}$  по изменчивости *RsaI*-локуса гена *PRL*, а от китайской выборки – на основе значений *G*-теста для *AluI*-локуса гена *GHI*. При этом все выборки бурятского скота ведут себя согласованно в отношении алтайской породы, четко отличаясь от нее по данным *G*-теста и  $F_{ST}$  для локуса гена *GHR* и по значениям  $F_{ST}$  для комплекса локусов генов *PRL*, *GHI* и *GHR*. Генетические расстояния Нея на основе комплекса генов также отделяют группу выборок бурятской породы от алтайской, на что указывает соотношение внутригруппового среднего попарного расстояния Нея у бурятской породы к среднему попарному расстоянию Нея между выборками бурятской породы из Китая, Монголии, России и алтайской породой. Наибольший вклад в межпородную дифференциацию двух пород вносит изменчивость гена *GHR*, что зафиксировано в результатах AMOVA (16 %) и  $F_{ST}$  (0.12–0.27).

Различия в генетической структуре исследованных выборок продемонстрировал кластерный анализ, выполненный в программе STRUCTURE. Четыре выявленных кластера в алтайской породе, китайской и монгольской выборках бурятского скота представлены специфично в каждой выборке. У российского бурятского скота отсутствует один кластер, не имеющий высокой частоты в других выборках. Наличие у бурятской и алтайской пород одних и тех же кластеров может отражать единство происхождения, выраженное в принадлежности к турано-монгольскому корню, однако их длительное самостоятельное

**Таблица 5.** Комплексные генотипы генов *GHI*, *GHR* и *PRL*, для которых установлено сцепление аллелей по неравновесию у бурятской породы крупного рогатого скота

<i>GHI-PRL</i>	$q^*$	<i>GHI-GHR</i>	$q$	<i>GHI-GHR-PRL</i>	$q$
Китай		Монголия		Россия	
<i>LL-AA</i>	0.308	<i>LL-AA</i>	0.080	<i>LL-AA-AA</i>	0.196
<i>LL-AB</i>	0.154	<i>LL-AG</i>	0.400	<i>LL-AA-AB</i>	0.039
<i>LV-AA</i>	0.154	<i>LL-GG</i>	0.160	<i>LL-AG-AA</i>	0.176
<i>LV-AB</i>	0.231	<i>LV-AG</i>	0.200	<i>LL-AG-AB</i>	0.039
<i>VV-AA</i>	0.077	<i>LV-GG</i>	0.120	<i>LL-GG-AA</i>	0.176
<i>VV-BB</i>	0.077	<i>VV-GG</i>	0.040	<i>LL-GG-AB</i>	0.118
Россия		Россия		<i>LL-GG-BB</i>	0.020
<i>LL-AA</i>	0.549	<i>LL-AA</i>	0.235	<i>LV-AA-AA</i>	0.020
<i>LL-AB</i>	0.196	<i>LL-AG</i>	0.216	<i>LV-AG-AA</i>	0.098
<i>LL-BB</i>	0.020	<i>LL-GG</i>	0.314	<i>LV-AG-AB</i>	0.059
<i>LV-AA</i>	0.118	<i>LV-AA</i>	0.020	<i>LV-GG-BB</i>	0.020
<i>LV-AB</i>	0.059	<i>LV-AG</i>	0.157	<i>VV-GG-AB</i>	0.039
<i>LV-BB</i>	0.020	<i>LV-GG</i>	0.020		
<i>VV-AB</i>	0.039	<i>VV-GG</i>	0.039		
Монголия					
<i>LL-AA</i>	0.280				
<i>LL-AB</i>	0.320				
<i>LL-BB</i>	0.040				
<i>LV-AA</i>	0.120				
<i>LV-AB</i>	0.120				
<i>LV-BB</i>	0.080				
<i>VV-BB</i>	0.040				

\*  $q$  – частота комплексного генотипа.

существование наложило отпечаток на генетическую структуру, что выражено в доминировании одного из кластеров в выборке алтайской породы. При этом наблюдается и внутривидовая дифференциация у бурятского скота. Отметим, что различия на внутривидовом уровне у бурятской породы определяют локусы генов *PRL* и *GHI*, на межпородном с алтайской породой – исследованный локус гена *GHR*, что отражает неодинаковый вклад разных локусов в дифференциацию на разных уровнях. Сохранится ли выявленная картина изменчивости при расширении массива данных, станет ясно в более масштабных исследованиях. Однако полученные результаты демонстрируют необходимость учета изменчивости в субпопуляциях при сохранении малочисленных пород.

Проведенный нами анализ на неравновесие по сцеплению изученных генов доказал его достоверное существование для следующих пар генов у бурятской породы: *GHI-GHR*, *GHI-PRL*, *GHR-PRL*. Среди возможных объяснений выявленного сходного характера сцепления по неравновесию аллелей перечисленных генов во всех

исследованных выборках крупного рогатого скота можно было бы рассматривать преимущественное использование одних и тех же быков-производителей, если бы наши выборки не представляли независимые стада и их смешение было бы возможно. Исходя из этого, наиболее вероятно, что обнаруженный сходный характер сцепления по неравновесию аллелей исследованных генов может являться результатом действия прямого или опосредованного естественного и/или искусственного отбора. Неравновесие по сцеплению генов *GH1* и *PRL* с геном *GHR* не противоречит известным данным о возможной конкуренции продуктов генов пролактина и гормона роста за связывание с рецептором последнего (Inoue et al., 2001).

Сохранение генетической изменчивости и предотвращение инбридинга особенно важны для малочисленных аборигенных пород, находящихся в критическом статусе. Аллельное разнообразие генов, подверженных сильному давлению отбора у коммерческих пород, может привести к значительному смещению частот аллелей в ту или иную сторону вплоть до их фиксации, что способно негативно отразиться на их жизнеспособности в условиях изменения климата и агробиоценозов. При этом генетический потенциал хорошо адаптированных к критическим эколого-географическим условиям жизни аборигенных пород, сохранивших к тому же устойчивость к заболеваниям, распространенным на территориях их обитания, может быть востребован, в том числе для традиционного животноводства и породообразовательного процесса. Поскольку у пород, находящихся на свободном выпасе, искусственное осеменение практически не используется, необходимо создание стратегии сохранения *in situ* и *ex situ* с учетом мониторинга по ДНК-маркерам. Полученные данные являются первыми популяционно-генетическими характеристиками бурятской и алтайской пород на основе изменчивости генов-кандидатов.

## Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 16-54-44060) и в рамках государственного задания № 0112-2014-003 «Изучение генофондов сельскохозяйственных животных».

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы / References

Балков М.Н. Бурятский крупный рогатый скот, его происхождение и пути улучшения. Улан-Удэ: Бурят. кн. изд-во, 1962. [Balkov M.N. Buryat Cattle: Origin and Ways of Improvement. Ulan-Ude: Buryat Publ. House, 1962. (in Russian)]  
Горлов И.Ф., Федюнин А.А., Ранделин Д.А., Сулимова Г.Е. Полиморфизм генов *bGH1*, *RORC* и *DGAT1* у мясных пород крупного рогатого скота России. Генетика. 2014;50(12):1448-1454. [Gorlov I.F., Fedyunin A.A., Randelin D.A., Sulimova G.E. Polymorphisms of *bGH*, *RORC*, and *DGAT1* genes in Russian beef cattle breeds. Russ. J. Genet. 2014;50(12):1302-1307.]  
Лазебная И.В., Лазебный О.Е., Сулимова Г.Е. Исследование генетической изменчивости якутской породы (*Bos taurus* L.) крупного рогатого скота с использованием генов пролактина *bPRL*, гормона роста *bGH1* и транскрипционного фактора *bPit1*. Генетика. 2010;46(3):425-428. [Lazebnaya I.V., Lazebny O.E., Sulimo-

va G.E. Study of genetic variation in Yakutian cattle (*Bos taurus* L.) using the prolactin *bPRL*, growth hormone *bGH*, and transcription factor *bPit-1*. Russ. J. Genet. 2010;46(3):377-380.]  
Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А., Сулимова Г.Е., Каштанов С.Н. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России (Ред. И.А. Захаров). М.: Наука, 2006. [Moiseeva I.G., Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. The Gene Pool of Farm Animals: The Genetic Resources of Livestock in Russia. (Ed. I.A. Zakharov). Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)]  
Столповский Ю.А., Ахани А.М., Евсюков А.Н., Кол Н.В., Рузина М.Н., Воронкова В.Н., Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров у пород крупного рогатого скота. Генетика. 2011;47(2):213-226. [Stolpovsky Yu.A., Ahani A.M., Evsukov A.N., Kol N.V., Ruzina M.N., Voronkova V.N., Sulimova G.E. Comparison of ISSR polymorphism among cattle breeds. Russ. J. Genet. 2011;47(2):189-200.]  
Уханов С.В., Столповский Ю.А., Банникова Л.В., Зубарева Л.А., Иванова З.И., Вердиев З.К. Генетические ресурсы крупного рогатого скота: редкие и исчезающие отечественные породы (Ред. И.А. Захаров). М.: Наука, 1993. [Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Bannikova L.V., Zubareva L.A., Ivanova Z.I., Verdiev Z.K. Cattle Genetic Resources: Rare and Endangered Native Breeds (Ed. I.A. Zakharov). Moscow: Nauka Publ., 1993. (in Russian)]  
Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B. Stat. Methodol. 1995;57(1):289-300.  
Chrenek P., Huba J., Oravcova M., Hetenyi L., Peskovicova D., Bulla J. Genotypes of *bGH* and *bPRL* genes in relationships to milk production. Proc. of the 50th Annual Meeting of the EAAP: Book of Abstracts. Zurich, 1999;40.  
Chung E.R., Rhim T.J., Han S.K. Associations between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. Korean J. Anim. Sci. 1996;38:321-336.  
Di Stasio L., Destefanis G., Brugiapaglia A., Albera A., Rolando A. Polymorphism of the *GHR* gene in cattle and relationships with meat production and quality. Anim. Genet. 2005;36(2):138-140. DOI 10.1111/j.1365-2052.2005.01244.x.  
Dmitriev N.G., Ernest L.K. Animal genetic resources of the USSR (No. FAO AHPH 65). FAO, Roma (Italia), 1989.  
Dybus A., Grzesiak W., Szatkowska I., Blaszczyk P. Association between the growth hormone combined genotypes and dairy traits in Polish Black-and-White cows. Anim. Sci. Pap. Rep. 2004;22(2):185-194.  
Hiendleder S., Lewalski H., Janke A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. Cytogenet. Genome Res. 2008;120(1-2):150-156. DOI 10.1159/000118756.  
Hradecka E., Citek J., Panicke L., Rehout V., Hanusova L. The relation of *GH*, *GHR* and *DGAT1* polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. Czech J. Anim. Sci. 2008;53(6):238-245.  
Inoue K., Goda H., Mogi C., Tomida M., Tsurugano S. The Role of Glucocorticoids and Retinoic Acid in the Pituitary Endocrine Cell Differentiation. In: Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action. CRC Press, 2001;73.  
Kantanen J., Edwards C.J., Bradley D.G., Viinalass H., Thessler S., Ivanova Z., Kiselyova T., Cinkulov M., Popov R., Stojanovic S., Ammosov I., Vilkki J. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). Heredity. 2009;103(5):404-415. DOI 10.1038/hdy.2009.68.  
Lazebnaya I.V., Lazebny O.E., Khatami S.R., Sulimova G.E. Use of the Bovine Prolactin Gene (*bPRL*) for Estimating Genetic Variation and Milk Production in Aboriginal Russian Breeds of *Bos taurus* L. In: Nagy G.M. (Ed.). Prolactin. InTech, 2013. DOI 10.5772/54756. Available at: <https://www.intechopen.com/books/prolactin/use-of-the-bovine-prolactin-gene-bprl-for-estimating-genetic-variation-and-milk-production-in-aborig>

- Lewin H.A., Schmitt K., Hubert R., van Eijk M.J., Arnheim N. Close linkage between bovine prolactin and *BoLA-DRB3* genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics*. 1992;13(1): 44-48. DOI 10.1016/0888-7543(92)90200-C.
- Mitra A., Schlee P., Balakrishnan C.R., Pirchner F. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *J. Anim. Breed. Genet.* 1995;112:71-74.
- Mwai O., Hanotte O., Kwon Y.J., Cho S. African indigenous cattle: unique genetic resources in a rapidly changing world. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2015;28(7):911-921. DOI 10.5713/ajas.15.0002R.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978;89(3):583-590.
- Shabtay A. Adaptive traits of indigenous cattle breeds: The Mediterranean Baladi as a case study. *Meat Sci.* 2015;109:27-39. DOI 10.1016/j.meatsci.2015.05.014.
- Tapio I., Tapio M., Li M.H., Popov R., Ivanova Z., Kantanen J. Estimation of relatedness among non-pedigreed Yakutian cryo-bank bulls using molecular data: implications for conservation and breed management. *Genet. Sel. Evol.* 2010;42(1):28. DOI 10.1186/1297-9686-42-28.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyshev K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity*. 2017; 120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.

---

#### ORCID ID

I.V. Lazebnaya [orcid.org/0000-0001-7548-3615](https://orcid.org/0000-0001-7548-3615)

A.V. Perchun [orcid.org/0000-0003-4807-4335](https://orcid.org/0000-0003-4807-4335)

B.B. Lhasaranov [orcid.org/0000-0001-8699-5106](https://orcid.org/0000-0001-8699-5106)

O.E. Lazebny [orcid.org/0000-0003-3136-0415](https://orcid.org/0000-0003-3136-0415)

Yu.A. Stolpovskiy [orcid.org/0000-0003-2537-1900](https://orcid.org/0000-0003-2537-1900)

# Оценка современного состояния генофонда холмогорской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота на основе полногеномного SNP-анализа

А.В. Доцев<sup>1</sup>, А.А. Сермягин<sup>1</sup>, А.В. Шахин<sup>1</sup>, И.А. Паронян<sup>2</sup>, К.В. Племяшов<sup>2</sup>, Х. Рейер<sup>3</sup>, К. Виммерс<sup>3</sup>, Г. Брем<sup>1, 4</sup>, Н.А. Зиновьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московская область, Подольск, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

<sup>3</sup> Институт геномной биологии Института биологии домашних животных Лейбница, Думмерсторф, Германия

<sup>4</sup> Институт животноводства и генетики ветеринарно-медицинского университета, Вена, Австрия

Сохранение генофонда отечественных пород крупного рогатого скота является важной задачей для обеспечения продовольственной безопасности населения. В последние годы в Российской Федерации местные популяции скота либо замещаются высокопродуктивными импортными породами, либо происходит их метизация, в результате которой от исходной породы остается лишь незначительная часть генов. Целью нашей работы было выявление генетических различий между популяциями холмогорского и черно-пестрого скота с разной степенью кровности по голштинской породе. Нами выполнен анализ полногеномных SNP-профилей (SNP – однонуклеотидный полиморфизм) животных вышеуказанных пород. Холмогорская была подразделена на три группы: чистопородные (KHLM,  $n = 3$ ), голштинизированные (KHLM-HLST,  $n = 4$ ) и представители старого типа (KHLM-INTA,  $n = 15$ ); черно-пестрая – на четыре группы: чистопородные (BLWT,  $n = 9$ ), с долей кровности голштинского скота от 6 до 25 % (BLWT-75,  $n = 8$ ), от 80 до 99 % (BLWT-HLST,  $n = 10$ ) и представленные архивными образцами 1970–1980-х гг. (BLWT-OLD,  $n = 15$ ). В качестве группы сравнения были использованы животные голштинской породы (HLST,  $n = 27$ ). Обработку данных и расчеты проводили в программах PLINK 1.07, Admixture 1.3, SplitsTree 4.14.6 и R пакет StAMMP. После проведения контроля качества для анализа были отобраны 29 688 SNP. Многомерное шкалирование (MDS), кластерный анализ и дендрограмма, построенная по методу «сеть соседей» (Neighbor-Net), выявили наличие трех кластеров, относящихся к холмогорской, черно-пестрой и голштинской породам. В первый попали KHLM и KHLM-INTA, во второй – BLWT и BLWT-OLD, в третий – HLST, KHLM-HLST и BLWT-HLST. Образцы, относящиеся к группе BLWT-75, заняли промежуточное положение между HLST и BLWT. Таким образом, наши результаты показали, что в настоящее время сохранились популяции с уникальными генотипами отечественных пород, которые необходимо сохранять. Популяции животных, голштинизированные на 80 % и более, нельзя рассматривать в качестве холмогорской и черно-пестрой пород, правильнее их относить к голштинской породе отечественной селекции.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; однонуклеотидный полиморфизм; маркеры; полногеномный анализ; сохранение генофонда.

## Evaluation of current gene pool of Kholmogor and Black-and-white cattle breeds based on whole genome SNP analysis

A.V. Dotsev<sup>1</sup>, A.A. Sermyagin<sup>1</sup>, A.V. Shakhin<sup>1</sup>, I.A. Paronyan<sup>2</sup>, K.V. Plemyashov<sup>2</sup>, H. Reyer<sup>3</sup>, K. Wimmers<sup>3</sup>, G. Brem<sup>1, 4</sup>, N.A. Zinovieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Moscow Region, Podolsk, Russia

<sup>2</sup> Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Subsidiary of L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Pushkin, Russia

<sup>3</sup> Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Germany

<sup>4</sup> Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

Conservation of local cattle genetic resources is an important strategy for achieving Russia's food security. During last decades, in the Russian Federation, local livestock populations were either crossbred or replaced by highly productive imported breeds, which led to a loss of the major part of original breeds identities. The objective of our study was to identify genetic differences between the populations of Kholmogor and Black-and-white cattle with varying degrees of admixture with the Holstein breed. The aforementioned breeds were studied using their whole-genome single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes. The Kholmogor breed was subdivided into three groups: purebred (KHLM,  $n = 3$ ), admixed with Holsteins (KHLM-HLST,  $n = 4$ ) and representatives of old-type breed (KHLM-INTA,  $n = 15$ ). Black-and-white was subdivided into four groups: purebred (BLWT,  $n = 9$ ), with a low (BLWT-75,  $n = 8$ ) and a high (BLWT-HLST,  $n = 10$ ) level of admixture with Holstein, and represented by archival samples from the 1970s and 1980s (BLWT-OLD,  $n = 15$ ). The Holsteins genetic profiles (HLST,  $n = 27$ ) were taken as a comparison group. PLINK 1.07, Admixture 1.3, SplitsTree 4.14.6 and R package StAMPP were used to infer genetic relationship between the studied groups. After quality control, 29688 SNPs were selected for analysis. Multidimensional scaling (MDS), Admixture analysis and a dendrogram constructed using the Neighbor-Net method, revealed the presence of three clusters belonging to the Kholmogor, Black-and-white and Holstein breeds. The first one included KHLM

and KHLM-INTA, the second – BLWT and BLWT-OLD, and the third – HLST, KHLM-HLST and BLWT-HLST. The BLWT-75 samples were placed between HLST and BLWT. Thus, our results showed that currently the populations of native cattle breeds with valuable genotypes still exist. The populations with a high level of admixture with Holsteins could be considered neither as the Kholmogor nor as Black-and-white breeds, and would rather be referred as the Holstein breed of local breeding.

Key words: cattle; SNP; markers; whole-genome analysis; genetic resources conservation.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Доцев А.В., Сермягин А.А., Шахин А.В., Паронян И.А., Племяшов К.В., Рейер Х., Виммерс К., Брем Г., Зиновьева Н.А. Оценка современного состояния генофонда холмогорской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота на основе полногеномного SNP-анализа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):742-747. DOI 10.18699/VJ18.418

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Shakhin A.V., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Reyer H., Wimmers K., Brem G., Zinovieva N.A. Evaluation of current gene pool of Kholmogor and Black-and-white cattle breeds based on whole genome SNP analysis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):742-747. DOI 10.18699/VJ18.418

В течение столетий в разных регионах мира формировались группы крупного рогатого скота, хорошо приспособленные к местным природно-климатическим условиям. В результате искусственного и естественного отбора происходило закрепление признаков, отвечающих как хозяйственным потребностям человека, так и адаптации животных к окружающей среде. Сохранение этих генетических ресурсов является основой для успешного ведения животноводства в будущем, поскольку наличие богатого генофонда может быть использовано в создании новых и усовершенствовании уже существующих пород.

В Российской Федерации существует ряд ценных пород, которые сочетают в себе высокую продуктивность, адаптацию к локальным климатическим условиям, устойчивость к различным заболеваниям и неприхотливость в содержании. К таковым, в частности, относят холмогорскую и черно-пеструю породы.

Холмогорский скот сформировался в конце XVII в. в Холмогорском районе Архангельской области вследствие хороших условий кормления и отбора лучших особей для воспроизводства. С 1725 г. по приказу Петра I с целью улучшения холмогорского скота были завезены несколько десятков животных голландской породы. В период с 1765 по 1898 г. продолжали также завозить импортный скот из Голландии, Голштинии и Англии (Эрнст и др., 1977). В 1920-х гг. была начата целенаправленная племенная работа по совершенствованию породы (Кузнецов, 2016). В 1927 г. была открыта Государственная племенная книга холмогорского скота, а в 1934 г. организован государственный племенной рассадник. С 1980-х гг. для улучшения маточного поголовья стали использоваться быки голштинской породы (Дмитриев, Паронян, 1994).

Черно-пестрая порода создавалась в СССР в 1930–1940-е гг. путем скрещивания местных отродий и животных голландского корня и была утверждена в 1959 г. Большое влияние на формирование породы оказали быки-производители, завезенные из Германии, Голландии, Эстонии, Литвы и Швеции. В связи с тем, что создание породы проводилось на большой территории с привлечением местного скота, выделялись пять популяций: центральная (среднерусская), прибалтийская, уральская, си-

бирская и остальных зон СССР (Украина, Белоруссия, Средняя Азия, Закавказье) (Дмитриев, 1978; Кузнецов, 2016). Благодаря высокой молочной продуктивности и хорошим акклиматизационным способностям поголовье черно-пестрой породы стало одним из самых многочисленных в нашей стране (Эрнст и др., 1977). С 1980-х гг. наряду с другими породами черно-пестрый скот стал подвергаться массовой «голлштинизации».

Необходимым шагом в сохранении генофонда отечественных пород является проведение генетических исследований. В настоящее время наиболее подходящий метод – одновременный анализ нескольких десятков тысяч однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), распределенных по всему геному (Decker et al., 2009; Kuehn et al., 2011; McTavish et al., 2013). Проведенные исследования генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота на основании полногеномного сканирования SNP выявили уникальность их аллелофонда (Зиновьева и др., 2016; Sermyagin et al., 2018; Yurchenko et al., 2018).

Целью нашей работы было выявление генетических различий между популяциями холмогорского и черно-пестрого скота с разной степенью кровности по голштинской породе.

#### Материал и методы

Материалом для исследования служили образцы биоматериала (сперма и кровь) крупного рогатого скота холмогорской, черно-пестрой и голштинской пород. Животные холмогорской породы были разделены на три группы: чистопородные быки (KHLM,  $n = 3$ ), голштинизированные быки (KHLM-HLST,  $n = 4$ ) с долей кровности исходной породы от 1 до 20 % и представители старого типа из хозяйства «Инта», Республика Коми (KHLM-INTA,  $n = 15$ ). Животные черно-пестрой породы были разделены на четыре группы: чистопородные быки (BLWT,  $n = 9$ ), быки с долей кровности голштинского скота от 6 до 25 % (BLWT-75,  $n = 8$ ) и от 80 до 99 % (BLWT-HLST,  $n = 10$ ) и представленные архивными образцами 1970–1980-х гг. (BLWT-OLD,  $n = 15$ ). В качестве группы сравнения были взяты животные голштинской породы (HLST,  $n = 27$ ).

Геномную ДНК выделяли с использованием колонок Nexttec (Nexttec Biotechnology GmbH, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Полногеномный скрининг SNP проводили с помощью чипов Bovine SNP50 BeadChip (Illumina Inc., США) и GGP HD150K (Neogene/GeneSeek, США). Для проведения всех анализов использовали общие для этих чипов локусы, генотипированные не менее чем у 90 % животных, с частотой минорных аллелей не менее 5 % и соответствующие равновесию Харди–Вайнберга ( $p > 1e-6$ ). SNP с неизвестной позицией, локализованные на половых хромосомах и находящиеся в неравновесии по сцеплению (LD), также были исключены. У всех животных успешно генотипированные SNP составляли не менее 90 %.

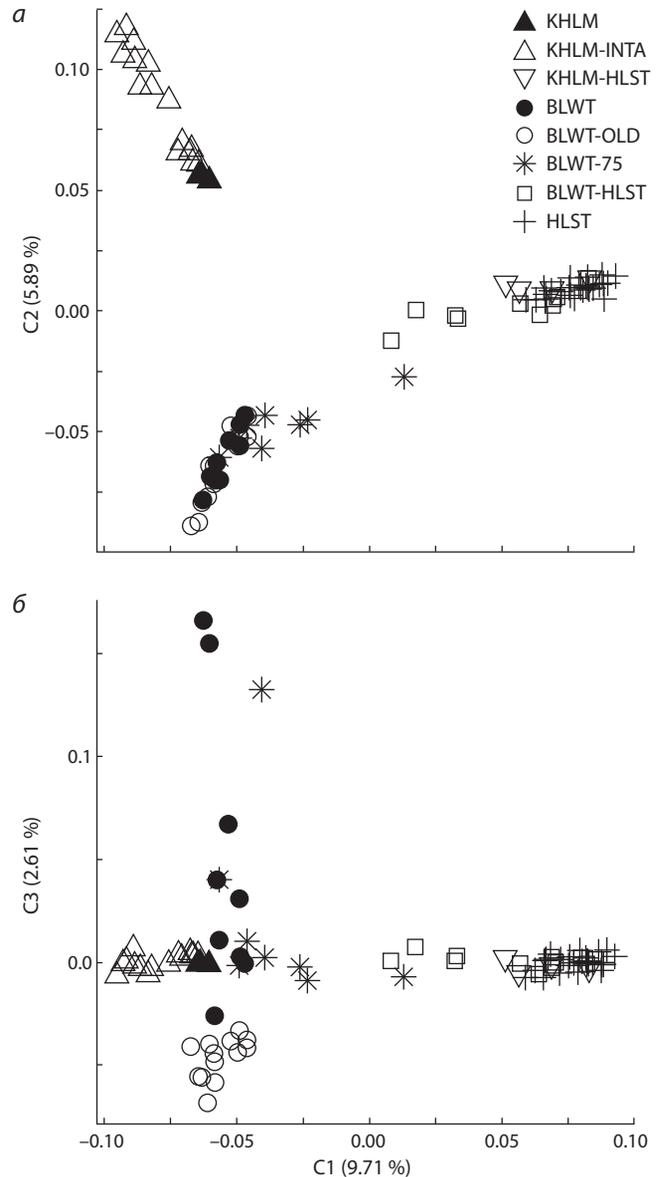
Для поиска маркеров, соответствующих вышеперечисленным требованиям, использовалось программное обеспечение PLINK 1.07 (Purcell et al., 2007). Также с помощью этой программы было выполнено многомерное шкалирование (MDS), основанное на дистанциях идентичности по состоянию (IBS, identical-by-state). Визуализацию MDS проводили в R пакете ggplot2 (Wickham, 2009). Кластерный анализ для определения структуры популяции был осуществлен в программе Admixture 1.3 (Alexander et al., 2009) и визуализирован с помощью R пакета rorhelper (Francis, 2017). Парные значения индекса фиксации ( $F_{ST}$ ) рассчитывали в R пакете StAMMP (Pembleton et al., 2013). Значения  $F_{ST}$  использовали для построения филогенетического дерева по алгоритму Neighbor-Net в программе SplitsTree 4.14.5 (Huson, Bryant, 2006). Исходные файлы создавали в программной среде R 3.5.0 (R Core Team, 2012).

## Результаты

После проведения контроля качества были отобраны 29688 SNP, которые использовались для всех последующих анализов.

Результаты многомерного шкалирования (MDS) показали, что все изучаемые группы разбиваются на три кластера, соответствующих холмогорской, черно-пестрой и голштинской породам (рис. 1, а). При этом по первой компоненте C1, которая объясняет 9.71 % изменчивости, наблюдалось отделение отечественных пород ( $C < 0$ ) от голштинской ( $C > 0$ ). Животные, относящиеся к голштинизированной черно-пестрой породе, располагались между двумя родительскими формами в соответствии со степенью кровности: кластер BLWT-75 перекрывался с BLWT, а кластер BLWT-HLST – с HLST. Чистокровные представители черно-пестрой породы (BLWT) кластеризовались вместе с архивными образцами (BLWT-OLD). Разделение последних наблюдалось только по третьей компоненте (см. рис. 1, б). Между группами KHLM и KHLM-INTA значимых различий не выявлено. Голштинизированные холмогорские особи (KHLM-HLST) были отнесены к кластеру HLST.

Анализ структуры популяции (рис. 2) показал различное историческое происхождение голштинской и российских пород. Так при  $K = 2$  произошло отделение холмогорской и черно-пестрой пород от голштинской, а при  $K = 3$  наблюдалось разделение двух отечественных пород. Доля геномного компонента голштинской породы в чисто-

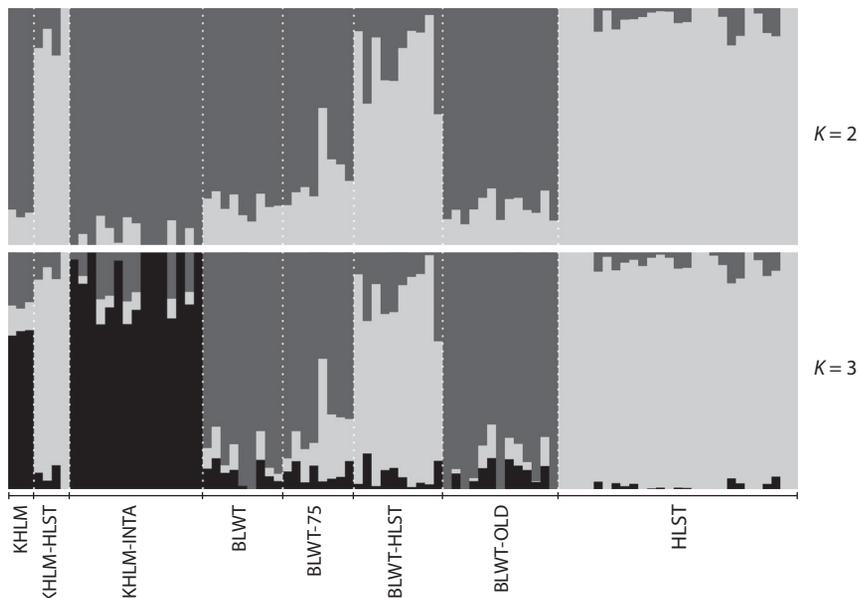


**Рис. 1.** Генотипическая изменчивость популяций холмогорской, черно-пестрой и голштинской пород на основании результатов многомерного шкалирования (MDS).

кровных холмогорской и черно-пестрой породах (KHLM, KHLM-INTA, BLWT и BLWT-OLD) была незначительной. В то же время голштинизированные линии (KHLM-HLST и BLWT-HLST) российских пород практически не отличались от чистокровных животных голштинской породы.

Следует отметить, что, согласно расчету ошибки перекрестной проверки (CV), наиболее вероятное число кластеров в нашей выборке было равно трем (рис. 3).

Данные кластерного анализа подтверждались результатами расчета парных значений индекса фиксации ( $F_{ST}$ ), согласно которым различий между группами HLST, KHLM-HLST и BLWT-HLST найдено не было. У групп, относящихся к холмогорской породе, генетическая отдаленность от голштинской породы группы KHLM-INTA была несколько выше, чем у KHLM:  $F_{ST}$  составил 0.101 и 0.087 соответственно. Генетические дистанции между



**Рис. 2.** Популяционная принадлежность чистокровных и голштинизированных представителей холмогорской и черно-пестрой пород крупного-рогатого скота, оцененная с помощью программы Admixture 1.3.

группами черно-пестрой породы BLWT и BLWT-OLD и голштинской породой практически не различались ( $F_{ST}$  равен 0.081 и 0.084) и были выше, чем у голштинизированной группы BLWT-75 ( $F_{ST} = 0.059$ ).

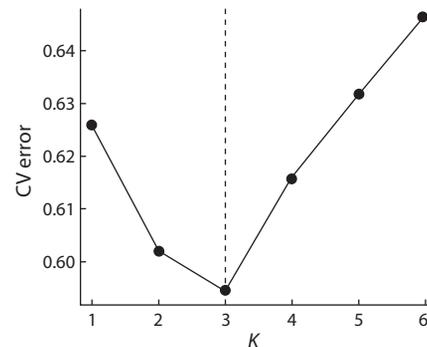
С целью визуализации попарных значений индекса фиксации, на их основе была построена дендрограмма по алгоритму «сети соседей» (NeighborNet) (рис. 4). При этом наблюдалось четкое разделение на три ветви, относящиеся к холмогорской (KHLM, KHLM-INTA), черно-пестрой (BLWT, BLWT-OLD, BLWT-75) и голштинской (HLST, KHLM-HLST и BLWT-HLST) породам.

### Обсуждение

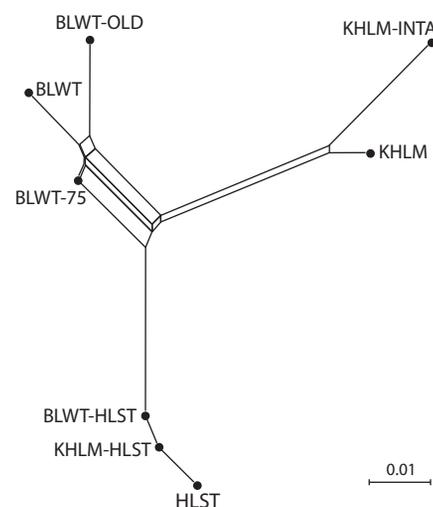
В последние время в Российской Федерации проводится активное улучшение отечественного скота путем его метизации с иностранными коммерческими породами, главным образом с голштинской. Показатели молочной продуктивности таких животных, как правило, намного превосходят результаты «не улучшенных», вследствие чего селекционеры продолжают повышать кровность по голштинской породе вплоть до 99 % (Сакса, Барсукова, 2013; Рухлова и др., 2014). Таким образом, улучшение показателей продуктивности отечественного скота происходит фактически только за счет его замены импортным. В результате теряется ценный генофонд, который столетиями формировался в наших породах, позволяя им приспосабливаться к сложным местным природно-климатическим условиям (Баранов, 2011; Матюков, Жариков, 2012; Матюков и др., 2013, 2018).

Следует отметить, что сильное увлечение завозом иностранных пород скота наблюдалось еще в конце XIX в. Так, академик А.Ш. Миддендорф считал, что основной путь улучшения скота заключается в замене местных отродьев на завезенные культурные породы либо в их широкой метизации (Верещагин, 1889). В то же время большая группа ученых во главе с Н.В. Верещагиным и А.А. Калантаром полагали, что более правильным будет совершенствовать отечественные породы и отродья молочного скота, одновременно улучшая их кормление и содержание. В своих работах они утверждали, что этот путь несколько длительный, но в то же время более верный и надежный (Калантар, 1927а, б).

Благодаря успехам генетики в XXI в., после расшифровки в 2009 г. генома крупного рогатого скота (Elsik et al., 2009; Zimin et al., 2009), стало возможным проводить полногеномные исследования на основе анализа однонуклеотидных



**Рис. 3.** Наиболее вероятное количество кластеров в исследуемой выборке, определенное с помощью расчета ошибки перекрестной проверки (CV error).



**Рис. 4.** Дендрограмма на основании попарных генетических дистанций ( $F_{ST}$ ), построенная по алгоритму «сети соседей» (NeighborNet).

полиморфизмов (SNP). С помощью данного метода можно не только исследовать историю происхождения пород и оценивать генетические связи между ними, но и осуществлять полногеномный поиск ассоциаций (GWAS), позволяющий выявлять связи между генетическими вариантами и фенотипическими признаками. Таким образом, становится возможной идентификация в отечественных породах ценных аллелей, связанных с резистентностью к заболеваниям, неприхотливостью к содержанию и т. д. Такая информация будет полезна для разработки программ сохранения и улучшения российской популяции крупного рогатого скота. Наша работа – первый шаг в решении этих задач.

С использованием около 30 тысяч генетических маркеров мы показали, что животные холмогорской и черно-пестрой пород с высокой долей кровности по голштинской породе формировали на MDS-плоте общий кластер с чистопородными животными голштинской породы, не отличались от них при выполнении кластерного анализа в программе Admixture и расчете попарных значений  $F_{ST}$ . При этом группы чистопородного холмогорского и черно-пестрого скота выделялись в отдельные кластеры. Это указывает на то, что в настоящее время еще сохранились особи, являющиеся носителями уникальных аллелей. Отделение изучаемых отечественных пород от голштинской по первой компоненте (C1) по результатам MDS-анализа и их общая структура при  $K = 2$  в Admixture свидетельствуют о том, что генетически холмогорская и черно-пестрая породы находятся ближе друг к другу, чем к голштинской, что, вероятно, обусловлено общностью их происхождения от северного великорусского скота.

Таким образом, мы считаем, что животных холмогорской и черно-пестрой пород, голштинизированных на 80 % и более, нельзя рассматривать в качестве представителей вышеназванных пород. Целесообразнее их относить к голштинской породе отечественной селекции. Для сохранения генофонда российских пород необходимо провести их оценку с применением полногеномного анализа SNP и выявить стада, сохранившие свою аутентичность. Улучшение отечественных пород иностранными следует проводить согласно программам разведения, предусматривающим использование геномных методов. Такой подход позволит сохранить адаптационные преимущества местного скота наравне с ценными аллелями улучшающей породы.

### Благодарности

Исследования проведены в рамках государственного задания ФАНО России, проект № АААА-А18-118021590134-3. Генотипирование животных выполнено при финансовой поддержке РНФ, проект № 14-36-00039.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

Баранов А.В. Проблемы сохранения биоразнообразия в животноводстве. Достижения науки и техники АПК. 2011;9:21-22. [Baranov A.V. Problems of biodiversity conservation in animal husbandry. Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC. 2011;9:21-22. (in Russian)]

Верещагин Н. Ответ господину Полторацкому на его заметку «К вопросу об улучшении скотоводства в России». Вестн. рус. сел. хоз-ва. 1889;8:657-662. [Vereshchagin N. Reply to Mr. Poltoratskiy's story "On the improvement of cattle breeding in Russia". Vestnik Russkogo Sel'skogo Khozyaystva = Herald of Russian Farming. 1889;8:657-662. (in Russian)]

Дмитриев Н.Г. Породы скота по странам мира. Л.: Справ. книга, 1978. [Dmitriev N.G. Cattle Breeds in the World. Leningrad: Spravochnaya Kniga Publ., 1978. (in Russian)]

Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. СПб., 1994. [Dmitriev N.G., Paronyan I.A. Genetic Resources of Farm Animals in Russia and Neighboring Countries. St. Petersburg, 1994. (in Russian)]

Зинovieва Н.А., Доцев А.В., Сермягин А.А., Виммерс К., Рейер Х., Солкнер Й., Денискова Т.Е., Брем Г. Изучение генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного анализа SNP. С.-х. биология. 2016;51(6):788-800. DOI 10.15389/agrobiology.2016.6.788rus. [Zinovieva N.A., Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Wimmers K., Reyer H., Sölkner J., Deniskova T.E., Brem G. Study of the genetic diversity and population structure of five Russian cattle breeds by genome-wide SNP analysis. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2016;51(2):788-800. DOI 10.15389/agrobiology.2016.6.788eng]

Калантар А.А. Судьбы «русского» скота. Пути сельского хозяйства. 1927a;10:181-190. [Kalantar A.A. The fate of the "Russian" cattle. Puti Sel'skogo Hozyajstva = Paths of Farming. 1927a;10:181-190. (in Russian)]

Калантар А.А. Судьбы «русского» скота. Пути сельского хозяйства. 1927b;11:100-108. [Kalantar A.A. The fate of the "Russian" cattle. Puti Sel'skogo Hozyajstva = Paths of Farming. 1927b;11:100-108. (in Russian)]

Кузнецов А.Ф. (ред.) Крупный рогатый скот: содержание, кормление, болезни: диагностика и лечение. СПб.: Изд-во «Лань», 2016. [Kuznetsov A.F. (Ed.) Cattle: Maintenance, Feeding, Diseases: Diagnosis and Treatment. St. Petersburg: Lan' Publ., 2016. (in Russian)]

Матюков В.С., Жариков Я.А. Методы современной селекции и сохранение генофонда молочного скота в Республике Коми (Рекомендации по оптимизации использования и сохранения генофонда холмогорского скота). Сыктывкар, 2012. [Matyukov V.S., Zharikov Ya.A. Methods of Modern Breeding and Preservation of the Gene Pool of Dairy Cattle in the Komi Republic (Recommendations for optimizing the use and conservation of the gene pool of Kholmogor cattle). Syktyvkar, 2012. (in Russian)]

Матюков В.С., Жариков Я.А., Зинovieва Н.А. Генетическая история и ценность генофонда исчезающей холмогорской породы. Молоч. и мясн. скотоводство. 2018;2:2-8. DOI 10.25632/MMS.2018.2.13747. [Matyukov V.S., Zharikov Ya.A., Zinovieva N.A. The genetic history and value of the gene pool of the endangered Kholmogory breed. Molochnoe i Myasnoe Skotovodstvo = Dairy and Beef Cattle Farming. 2018;2:2-8. DOI 10.25632/MMS.2018.2.13747. (in Russian)]

Матюков В.С., Тырина Ю.О., Кантанен Ю., Столповский Ю.А. О генетических особенностях и селекционной ценности местного скота (на примере холмогорской породы). С.-х. биология. 2013;2:19-30. DOI 10.15389/agrobiology.2013.2.19rus. [Matyukov V.S., Tyrina Yu.O., Kantanen Yu., Stolpovskiy Yu.A. On features and the selective value of the gene pool in local cattle by the example of the Kholmogory breed. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2013;2:19-30. DOI 10.15389/agrobiology.2013.2.19eng (in Russian)]

Рухлова Т.А., Ялуга В.Л., Прожерин В.П. Внутрпородный тип холмогорского скота «Северный». Farm Animals. 2014;2(6):48-55. [Rukhlova T.A., Yaluga V.L., Prozherin V.P. The "Northern" intrabreed type of Kholmogory cattle. Farm Animals. 2014;2(6):48-55. (in Russian)]

Сакса Е.И., Барсукова О.Е. Селекционно-генетическая характеристика высокопродуктивного голштинизированного черно-пестрого скота Ленинградской области. Молоч. и мясн. скотоводство. 2013;6:11-15. [Saksa E.I., Barsukova O.E. Breeding and genetic characterization of highly productive holsteinized black-and-white cattle in the Leningrad region. Molochnoe i Myasnoe Skotovodstvo = Dairy and Beef Cattle Farming. 2013;6:11-15. (in Russian)]

Эрнст Л.К., Бегучев А.П., Левантин Д.Л. Скотоводство. М.: Колос, 1977. [Ernst L.K., Beguchev A.P., Levantin D.L. Livestock Husbandry. Moscow: Kolos Publ., 1977. (in Russian)]

Alexander D.H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. Genome Res. 2009;19:1655-1664. DOI 10.1101/gr.094052.109.

Decker J.E., Pires J.C., Contant G.C., McKay S.D., Heaton M.P., Chen K., Cooper A., Vilkki J., Seabury C.M., Caetano A.R.,

- Johnson G.S., Brenneman R.A., Hanotte O., Eggert L.S., Wiener P., Kim J.-J., Kim K.S., Sonstegard T.S., VanTassell C.P., Neibergs H.L., McEwan J.C., Brauning R., Coutinho L.L., Babar M.E., Wilson G.A., McClure M.C., Rolf M.M., Kim J.W., Schnabel R.D., Taylor J.F. Resolving the evolution of extant and extinct ruminants with high-throughput phylogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106(44):18644-18649. DOI 10.1073/pnas.0904691106.
- Elsik C.G., Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science*. 2009;324(5926):522-528. DOI 10.1126/science.1169588.
- Francis R.M. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol. Ecol. Resour.* 2017;17:27-32. DOI 10.1111/1755-0998.12509.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23:254-267. DOI 10.1093/molbev/msj030.
- Kuehn L.A., Keele J.W., Bennett G.L., McDanel T.G., Smith T.P., Snelling W.M., Sonstegard T.S., Thallman R.M. Predicting breed composition using breed frequencies of 50,000 markers from the US Meat Animal Research Center 2,000 Bull Project. *J. Anim. Sci.* 2011;89(6):1742-1750. DOI 10.2527/jas.2010-3530.
- McTavish E.J., Decker J.E., Schnabel R.D., Taylor J.F., Hillis D.M. New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(15):E1398-E1406. DOI 10.1073/pnas.1303367110.
- Pembleton L.W., Cogan N.O., Forster J.W. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Mol. Ecol. Resour.* 2013;13:946-952. DOI 10.1111/1755-0998.12129.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:559-575. DOI 10.1086/519795.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2012. <http://www.Rproject.org>.
- Sermyagin A.A., Dotsev A.V., Gladyr E.A., Traspov A.A., Denis-kova T.E., Kostyunina O.V., Reyer H., Wimmers K., Barbato M., Paronyan I.A., Plemashov K.V., Sölkner J., Popov R.G., Brem G., Zinovieva N.A. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2018;50:37. DOI 10.1186/s12711-018-0408-8.
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2009.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemashov K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity*. 2018; 120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.
- Zimin A.V., Delcher A.L., Florea L., Kelley D.R., Schatz M.C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., VanTassell C.P., Sonstegard T.S., Marçais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J.A., Salzberg S.L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 2009;10(4):R42. DOI 10.1186/gb-2009-10-4-r42.

#### ORCID ID

A.V. Dotsev [orcid.org/0000-0003-3418-2511](http://orcid.org/0000-0003-3418-2511)  
A.A. Sermyagin [orcid.org/0000-0002-1799-6014](http://orcid.org/0000-0002-1799-6014)  
A.V. Shakhin [orcid.org/0000-0003-4959-878X](http://orcid.org/0000-0003-4959-878X)  
K.V. Plemashov [orcid.org/0000-0002-5952-0436](http://orcid.org/0000-0002-5952-0436)  
H. Reyer [orcid.org/0000-0001-6470-0434](http://orcid.org/0000-0001-6470-0434)  
K. Wimmers [orcid.org/0000-0002-9523-6790](http://orcid.org/0000-0002-9523-6790)  
G. Brem [orcid.org/0000-0002-7522-0708](http://orcid.org/0000-0002-7522-0708)  
N.A. Zinovieva [orcid.org/0000-0003-4017-6863](http://orcid.org/0000-0003-4017-6863)

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>  
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

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

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

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

Открытый доступ к полным текстам:  
на сайте ИЦиГ СО РАН – [bionet.nsc.ru/vogis/](http://bionet.nsc.ru/vogis/)  
платформе Epub – [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour)  
платформе Научной электронной библиотеки – [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://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».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: [vavilov\\_journal@bionet.nsc.ru](mailto:vavilov_journal@bionet.nsc.ru)

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук»,  
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963\*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 14.09.2018. Выход в свет 28.09.2018. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 14.18.

Уч.-изд. л. 15.7. Тираж 150 экз. Заказ № 225. Цена свободная.

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