

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 6 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)

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

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

Редакционная коллегия

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 6 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

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

E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

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

Editorial council

V.S. Baranov, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *L.A. Beshpalova*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Agriculture); *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; *V.M. Govorun*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *J. Le Gouis*, Dr. Sci., France; *I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany; *S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.E. Kerkis*, Dr. Sci., Brazil; *L.V. Khotyleva*, Full Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus; *E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *A.V. Kilchevsky*, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus; *S.V. Kostrov*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Chemistry), Russia; *B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands; *V.I. Molodin*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (History), Russia; *V.P. Puzyrev*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, 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; *S.V. Shestakov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *K.G. Skryabin*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *K.V. Slavin*, Professor, Dr. Sci., United States; *I.A. Tikhonovich*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *N.K. Yankovsky*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia; *L.I. Aftanas*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *T.G. Amstislavskaya*, Associate Professor, 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), Russia – Netherlands; *S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.N. Danilenko*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.A. Dolgikh*, Cand. Sci. (Biology), Russia; *N.N. Dygalo*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *T.A. Gavrilenko*, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *S.L. Kiselev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *A.V. Kochetov*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *Yu.M. Konstantinov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.A. Kozlov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *O. Krebs*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany; *I.N. Lavrik*, Cand. Sci. (Chemistry), Germany; *L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.Yu. Makeev*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Russia; *M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *N.A. Provorov*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *D.V. Pyshnyi*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Chemistry), Russia; *A.V. Ratushny*, Cand. Sci. (Biology), United States; *E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *M.G. Samsonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.A. Stepanov*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *M.I. Voevoda*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia

Генетика человека

- 571 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Распространенность арктического варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Сибири
Б.А. Малярчук, М.В. Деренко, Г.А. Денисова, А.Н. Литвинов

Генетика и селекция животных

- 576 **ОБЗОР**
Генетические маркеры в мясном овцеводстве
А.В. Дейкин, М.И. Селионова, А.Ю. Криворучко, Д.В. Коваленко, В.И. Трухачев

- 584 **ОБЗОР**
Полиморфизм локусов масти у мини-свиней
С.В. Никитин, К.С. Шатохин, С.П. Князев, Г.М. Гончаренко, В.И. Запорожец, В.И. Ермолаев

Генетика и селекция растений

- 596 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров *R*-генов устойчивости
О.Ю. Антонова, Н.А. Швачко, Л.Ю. Новикова, О.Ю. Шувалов, Л.И. Костина, Н.С. Клименко, А.Р. Шувалова, Т.А. Гавриленко
- 607 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Комплексная оценка исходного материала яблони для селекции на иммунитет и качество плодов
Е.В. Ульяновская, Т.Г. Причко, Л.Д. Чалая
- 616 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетический контроль устойчивости образцов местного ячменя к ринхоспориозу
О.Н. Соболева, Г.С. Коновалова, Е.Е. Радченко
- 623 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе
О.Н. Шуплецова, И.Н. Щенникова

- 629 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Устойчивость к листовым фитопатогенам гибридных (F_4 , F_5) форм яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в различных эколого-географических условиях
Е.И. Рипбергер, Н.А. Боме, Д. Траутц

Генетические ресурсы растений

- 636 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса (*Avena* L.)
И.Г. Лоскутов, Т.В. Шеленга, А.В. Конарев, А.Л. Шаварда, Е.В. Блинова, Н.И. Дзюбенко

Хромосомная инженерия и отдаленная гибридизация

- 643 **ОБЗОР**
Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров
М.Ф. Санамьян, Ш.У. Бобохужаев, А.Х. Макамов, С.Г. Ачилов, И.Ю. Абдурахмонов

- 653 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Наследование белковых маркеров в ряду поколений межвидовых гибридов хлопчатника
Ш. Юнусханов, З.Л. Абдуразакова

- 658 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Межвидовые гибриды некоторых восточноазиатских представителей рода *Chrysanthemum* L. и анализ их устойчивости
А.И. Недолужко

Экологическая генетика

- 666 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические показатели яровой пшеницы
А.М. Субботин, М.В. Нарушко, Н.А. Боме, С.А. Петров, В.А. Мальчевский, М.А. Габдуллин

- 673 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическое разнообразие трех вирусов яблони, выделенных в Беларуси
П.В. Кузмицкая, О.Ю. Урбанович

Молекулярная генетика

- 683 **ОБЗОР**
Гетерозис: современные тенденции
в изучении молекулярных
механизмов
М.Н. Шаптуренко, Л.В. Хотылева

Филогенетика

- 695 **ОБЗОР**
Филогенетические связи между
палеоарктическими видами
Anopheles комплекса *maculipennis*
(Diptera: Culicidae), установленные
при использовании разных методов.
Проблема консенсуса
О.В. Ваулин, Ю.М. Новиков

Физиологическая генетика и гентоксикология

- 704 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние половых хемосигналов
самок на мукозальный иммунитет
легких у самцов мышей линий
BALB/c и C57BL/6
Г.В. Концевая, Е.А. Литвинова, М.П. Мошкин
- 708 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ингибирование мутагенной
активации орто-аминоазотолуола
повышает его канцерогенность
для печени мышей
*В.И. Каледин, Л.П. Овчинникова, С.И. Ильницкая,
Т.С. Морозкова, Н.А. Попова*

Клеточная биология

- 716 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Режим однократной инъекции
препарата двуцепочечной ДНК после
каждой инъекции циклофосфана,
приводящий к эрадикации
первичного асцита Кребс-2
*Е.А. Поттер, Е.В. Долгова, А.М. Минкевич,
В.П. Николин, Н.А. Попова, Я.Р. Ефремов,
С.И. Байбородин, В.А. Рогачев, А.С. Проскурина,
О.С. Таранов, Е.И. Верещагин, А.А. Останин,
Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, С.С. Богачев*
- 723 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Разработка регламента
терапевтического режима,
основанного на синергичном
действии циклофосфана
и препаратов двуцепочечной
ДНК, приводящего к полному
вылечиванию экспериментальных
животных от асцитной формы
опухоли мыши Кребс-2
*Е.А. Поттер, Е.В. Долгова, А.С. Проскурина,
Я.Р. Ефремов, О.С. Таранов, В.П. Николин,
Н.А. Попова, Т.Д. Дубатолова, Д.Д. Петрова,
Е.И. Верещагин, А.М. Минкевич, О.М. Андрушкевич,
С.И. Байбородин, В.А. Рогачев, А.А. Останин,
Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, С.С. Богачев*

Human genetics

- 571 **ORIGINAL ARTICLE**
Distribution of the arctic variant of the *CPT1A* gene in indigenous populations of Siberia
B.A. Malyarchuk, M.V. Derenko, G.A. Denisova, A.N. Litvinov

Animal genetics and breeding

- 576 **REVIEW**
Genetic markers in sheep meat breeding
A.V. Deykin, M.I. Selionova, A.Yu. Krivoruchko, D.V. Kovalenko, V.I. Truhachev
- 584 **REVIEW**
Polymorphic loci of coat color in mini-pigs
S.V. Nikitin, K.S. Shatokhin, S.P. Knyazev, G.M. Goncharenko, V.I. Zaporozhets, V.I. Ermolayev

Plant genetics and breeding

- 596 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes
O.Y. Antonova, N.A. Shvachko, L.Y. Novikova, O.Y. Shuvalov, L.I. Kostina, N.S. Klimenko, A.R. Shuvalova, T.A. Gavrilenko
- 607 **ORIGINAL ARTICLE**
A comprehensive assessment of source material for apple breeding for immunity and fruit quality
E.V. Ulyanovskaya, T.G. Prichko, L.D. Chalaya
- 616 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic control of scald resistance in barley landraces
O.N. Soboleva, G.S. Konovalova, E.E. Radchenko
- 623 **ORIGINAL ARTICLE**
Results of using cell technologies for creation of new barley varieties resistant against aluminum toxicity and drought
O.N. Shupletsova, I.N. Shchennikova

- 629 **ORIGINAL ARTICLE**
Resistance of hybrid (F_4 , F_5) forms of the spring soft wheat (*Triticum aestivum* L.) to leaf phytopathogens under different ecological and geographical conditions
E.I. Ripberger, N.A. Bome, D. Trautz

Plant genetic resources

- 636 **ORIGINAL ARTICLE**
The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena* L.)
I.G. Loskutov, T.V. Shelenga, A.V. Konarev, A.L. Shavarda, E.V. Blinova, N.I. Dzubenko

Chromosome engineering and remote hybridization

- 643 **REVIEW**
The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR-markers
M.F. Sanamyan, Sh.U. Bobokhujaev, A.X. Makamov, S.G. Achilov, I.Y. Abdurakhmonov

- 653 **ORIGINAL ARTICLE**
Inheritance of protein markers in the succession of generations of interspecific hybrids of cotton
Sh. Yunuskhonov, Z. Abdurazakova

- 658 **ORIGINAL ARTICLE**
Interspecific hybrids of some East Asian representatives of the genus *Chrysanthemum* L. and analysis of their sustainability
A.I. Nedoluzhko

Ecological genetics

- 666 **ORIGINAL ARTICLE**
Influence of permafrost microorganisms on morphophysiological indicators of spring wheat
A.M. Subbotin, M.V. Narushko, N.A. Bome, S.A. Petrov, V.A. Malchevskiy, M.A. Gabdullin
- 673 **ORIGINAL ARTICLE**
Distribution and genetic diversity of three apple viruses in Belarus
P.V. Kuzmitskaya, O.Yu. Urbanovich

Molecular genetics

- 683 **REVIEW**
Heterosis: current advances
in the search for molecular mechanisms
M.N. Shapturenko, L.V. Khotyleva

Phylogenetics

- 695 **REVIEW**
Phylogenetic relationships between
Palearctic species of the *Anopheles*
maculipennis complex (Diptera:
Culicidae) revealed by different
approaches and markers. The problem
of consensus
O.V. Vaulin, Yu.M. Novikov

Physiological genetics and genotoxicology

- 704 **ORIGINAL ARTICLE**
Effects of female sexual chemosignals
on mucosal immunity in BALB/c and
C57BL/6 male mice
G.V. Kontsevaya, E.A. Litvinova, M.P. Moshkin
- 708 **ORIGINAL ARTICLE**
Inhibition of mutagenic activation
of ortho-aminoazotoluene increases
its carcinogenicity for mouse liver
*V.I. Kaledin, L.P. Ovchinnikova, S.I. Il'nitskaya,
T.S. Morozkova, N.A. Popova*

Cell biology

- 716 **ORIGINAL ARTICLE**
Eradication of Krebs-2 primary
ascites via a single-injection regimen
of cyclophosphamide and double-
stranded DNA
*E.A. Potter, E.V. Dolgova, A.M. Minkevich, V.P. Nikolin,
N.A. Popova, Ya.R. Efremov, S.I. Baiborodin,
V.A. Rogachev, A.S. Proskurina, O.S. Taranov,
E.I. Vereschagin, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh,
N.A. Kolchanov, S.S. Bogachev*
- 723 **ORIGINAL ARTICLE**
Development of the therapeutic
regimen based on the synergistic
activity of cyclophosphamide and
double-stranded DNA preparation
which results in complete cure of mice
engrafted with Krebs-2 ascites
*E.A. Potter, E.V. Dolgova, A.S. Proskurina,
Ya.R. Efremov, O.S. Taranov, V.P. Nikolin, N.A. Popova,
T.D. Dubatolova, D.D. Petrova, E.I. Vereschagin,
A.M. Minkevich, O.M. Andrushkevich, S.I. Baiborodin,
V.A. Rogachev, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh,
N.A. Kolchanov, S.S. Bogachev*



Уважаемые коллеги, дорогие читатели!

В текущем номере журнала вашему вниманию предложены результаты фундаментальных медико-биологических и селекционно-генетических оригинальных исследований, а также обзорные статьи.

Результаты фундаментальных медико-биологических исследований представлены в разделах «Генетика человека», «Физиологическая генетика и генотоксикология» и «Клеточная биология». Коллектив авторов из Института биологических проблем Севера ДВО РАН впервые среди коренного населения Сибири осуществил популяционный скрининг «арктической» мутации в локусе rs80356779, потенциально связанной с гипокетонной гипогликемией и синдромом внезапной детской смерти. Выявлен гаплотип, несущий эту мутацию. Авторы предположили, что распространению «арктической» мутации в популяциях коренного населения Северо-Восточной Азии способствовали процессы расширения эскимосской культуры морского зверобойного промысла и ассимиляции эскимосов чукчами и коряками.

В одной из статей раздела «Физиологическая генетика и генотоксикология» показано, что сигнальные механизмы защиты млекопитающих от инфекционных рисков, связанных с размножением, обеспечивают генотип-зависимую мобилизацию неспецифического иммунитета без существенной активации физиологических механизмов стресса. Оригинальное исследование выполнено в Федеральном исследовательском центре «Институт цитологии и генетики СО РАН».

Различные аспекты доклинических испытаний препарата двуцепочечной ДНК и циклофосфана рассматриваются в разделе «Клеточная биология». Разработан основанный на синергичном действии этих препаратов регламент терапевтического режима, приводящего к полному выздоровлению экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мыши Кребс-2.

Фундаментальные генетико-селекционные исследования в этом номере представлены работами в области генетики растений. Основные потери урожая возделываемых культур происходят вследствие атаки фитопатогенов и вредителей, а также воздействия неблагоприятных почвенно-климатических условий. В связи с этим важнейшая тема исследований в области генетики и селекции – иммунитет растений и устойчивость к абиотическим стрессам. Этой актуальной проблеме посвящены оригинальные статьи в разделах «Генетика и селекция растений» и «Экологическая генетика». В фокус внимания попали зерновые и плодовые культуры, а также картофель.

Критическое значение для селекции растений на устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу имеет расширение генетического разнообразия за счет дикорастущих и возделываемых сородичей. Коллектив авторов из Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова применил метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса. Среди дикорастущих видов овса выделены образцы, которые могут использоваться как потенциальные источники биохимических признаков качества при селекции. Основной способ передачи чужеродных генов в геномы культурных видов растений – технологии, ориентированные на манипуляции с хромосомами (хромосомная инженерия). Некоторым вопросам хромосомной инженерии и отдаленной гибридизации посвящен одноименный раздел номера. Представлены исследования на хлопчатнике и хризантеме.

Помимо оригинальных статей в текущем номере опубликовано несколько обзорных работ. Вниманию читателей предложены обзорные статьи по использованию генетических маркеров в животноводстве, статья, анализирующая известные на сегодняшний день молекулярные механизмы гетерозиса, и проблемный обзор, посвященный филогении рода *Anopheles*.

Последний (шестой) номер журнала в 2016 г. будет посвящен направлениям «Биоинформатика и системная биология» и «Биотехнология». Рады сообщить нашим авторам и читателям, что с 2017 г. периодичность журнала увеличится до восьми номеров в год, что позволит сократить срок от поступления статьи до ее выхода в свет.

Напоминаем, что оригинальные и обзорные статьи в области генетики и селекции принимаются онлайн на сайте журнала <http://vavilov.elpub.ru/jour/>

Другие материалы – оригинальные статьи по истории генетики, персоналии, комментарии, заметки об итогах научных мероприятий, сообщения об экспедициях и прочие интересные для генетического сообщества сведения – можно опубликовать в электронном издании «Письма в Вавиловский журнал» (<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/people/>). Заявки принимаются по электронной почте: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Академик В.К. Шумный

Распространенность арктического варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Сибири

Б.А. Мальярчук , М.В. Деренко, Г.А. Денисова, А.Н. Литвинов

Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

Впервые среди коренного населения Сибири (у чукчей, коряков, эвенов, эвенков, якутов, бурят и алтайцев) и Восточной Азии (корейцев) проведен популяционный скрининг «арктической» мутации G > A в локусе rs80356779 гена карнитин-о-пальмитоил-трансферазы 1A (*CPT1A*). Предполагается, что этот вариант полиморфизма возник у предков эскимосов в результате адаптации к диете, обогащенной жирными кислотами, и/или экстремальным природно-климатическим условиям Крайнего Севера. Известно также, что среди американских эскимосов – носителей гомозигот арктического варианта гена *CPT1A* – достоверно чаще выявляются случаи заболеваний, связанных с дефицитом фермента *CPT1A* и, как следствие, с гипокетонной гипогликемией и синдромом внезапной детской смерти. С другой стороны, эта мутация может быть кардиопротективной, так как ее наличие ассоциируется с повышенным содержанием липопротеинов высокой плотности и аполипопротеина A1 в плазме крови. В проведенном нами исследовании высокая частота арктического варианта гена *CPT1A* обнаружена только в береговых популяциях Северо-Восточной Азии: 66 % у коряков, 56 % у чукчей и 30 % у эвенов, а также в единичном случае (частота 1 %) у эвенков Центральной Сибири. Анализ полиморфизма, выявленного с помощью высокопроизводительного секвенирования, показал, что помимо исследуемого локуса rs80356779 еще пять локусов являются информативными в плане прояснения структуры гаплотипов гена *CPT1A* (rs2278908, rs2278907, rs2924699, rs7112615 и rs2229738). Обнаружено, что гаплотип, несущий «арктическую» мутацию, возник однократно на основе гаплотипа, встречающегося в настоящее время в различных популяциях Евразии. Предполагается, что распространению «арктической» мутации в популяциях коренного населения Северо-Восточной Азии способствовали процессы расширения эскимосской культуры морского зверобойного промысла и ассимиляции эскимосов чукчами и коряками.

Ключевые слова: карнитин-о-пальмитоилтрансфераза 1A (*CPT1A*); популяции человека; Сибирь; молекулярная филогеография; адаптивная эволюция.

Distribution of the arctic variant of the *CPT1A* gene in indigenous populations of Siberia

B.A. Malyarchuk , M.V. Derenko, G.A. Denisova, A.N. Litvinov

Institute of Biological Problems of the North Far-East Branch of Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

Population screening of the Arctic variant, which has arisen due to the G > A mutation at locus rs80356779 in the *CPT1A* gene, has been performed for the first time among indigenous peoples of Siberia (Chukchi, Koryaks, Evens, Evenks, Yakuts, Buryats and Altaians) and East Asia (Koreans). It is assumed that *CPT1A* Arctic variant originated from Eskimo ancestors, probably as a result of adaptation to a high-fat diet and/or to the extremely cold environment. It is also known that the homozygous Arctic variant is associated with hypoketotic hypoglycemia attributable to *CPT1A* deficiency and high infant mortality and occurs at high frequency in American Eskimo. On the other hand, the association of *CPT1A* Arctic variant with increased levels of HDL-cholesterol and apolipoprotein A1 in blood plasma suggests that this mutation might have a cardioprotective role. In the present study, a high frequency of *CPT1A* Arctic variant has been found in coastal populations of Northeast Asia – in Koryaks (66 %), Chukchi (56 %) and Evens (30 %), and singularly (at a frequency of 1 %) in Evenks of Central Siberia. Five polymorphic loci relevant to the haplotypic structure of *CPT1A* gene (rs2278908, rs2278907, rs2924699, rs7112615 and rs2229738) were revealed by high-throughput DNA sequencing in addition to locus rs80356779 studied here. It was found that the Arctic variant haplotype has arisen only once on the basis of the haplotype, which is widespread in modern populations of Eurasia. We assume that the expansion of Eskimo culture of the sea mammal hunting as well as Eskimo assimilation by Chukchi and Koryaks have contributed to the spread of the *CPT1A* Arctic variant across the populations of indigenous peoples of Northeast Asia.

Key words: carnitine palmitoyltransferase 1A (*CPT1A*); human populations; Siberia; molecular phylogeography; adaptive evolution.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мальярчук Б.А., Деренко М.В., Денисова Г.А., Литвинов А.Н. Распространенность арктического варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):571-575. DOI 10.18699/VJ16.130

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Denisova G.A., Litvinov A.N. Distribution of the arctic variant of the *CPT1A* gene in indigenous populations of Siberia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):571-575. DOI 10.18699/VJ16.130

ORIGINAL ARTICLE

Received 30.03.2015

Accepted for publication 22.10.2015

© AUTHORS, 2016

В исследованиях генетического полиморфизма популяций коренного населения Сибири был обнаружен целый ряд генов, предположительно вовлеченных в процесс адаптации к холоду (*THADA*, *ITPR3*, *GNGT1*, *PRKG1*, *RELN*, *CPT1A* и *LRP5*) (Cardona et al., 2014). Однако самые строгие сигналы положительного отбора были выявлены в участке размером 3 Mb на хромосоме 11 (между позициями 66 и 69 Mb) в популяциях Северо-Восточной Азии: у эскимосов, чукчей и коряков. В этом участке находятся два кандидатных гена: *CPT1A* и *LRP5*. Ген *LRP5*, кодирующий белок, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности, играет важную роль в процессах роста костей, метаболизма холестерина, систолического кровяного давления. Ген *CPT1A* кодирует карнитин-о-пальмитоилтрансферазу 1A – один из ключевых ферментов транспорта жирных кислот в митохондриальный матрикс для их последующего бета-окисления. Так как оба указанных гена участвуют в метаболизме липидов, A. Cardona с коллегами (2014) предположили, что отбор генетических вариантов мог быть связан с адаптацией как к холоду и другим неблагоприятным условиям Крайнего Севера, так и к традиционной диете коренных жителей этого региона. Как известно, главными продуктами питания эскимосов, а также береговых чукчей и коряков издревле были мясо и жир ластоногих и китов. Несмотря на жирную пищу, в сыворотке крови представителей этих народов наблюдаются довольно низкие уровни холестерина и липидов, что, по-видимому, свидетельствует о том, что в эволюции коренных народов Крайнего Севера важную роль играли сопряженные процессы адаптации к диете и экстремальным факторам среды (Rajakumar et al., 2009; Lemas et al., 2012).

Более детальная информация о генетических вариантах, имеющих отношение к адаптации коренного населения к условиям Крайнего Севера, недавно была получена с помощью полногеномного секвенирования ДНК азиатских эскимосов, чукчей и коряков (Clemente et al., 2014). Анализ молекулярных данных позволил выявить 148 SNP (однонуклеотидных полиморфизмов), однако из них только один вариант прошел через многочисленные статистические фильтры – несинонимичная замена G > A в локусе rs80356779 гена *CPT1A*. Анализ генетического материала от современного и древнего населения Евразии и Америки показал, что этот вариант распространен лишь в популяциях Арктического региона, хотя сведения об изменчивости гена *CPT1A* в современных популяциях Сибири были очень фрагментарными: в работе F.J. Clemente с коллегами (2014) исследовано всего лишь 25 представителей азиатских эскимосов, чукчей и коряков. Что касается древних образцов, то, по данным этой работы, «арктическая» мутация отсутствовала в генетическом материале представителя позднего палеолита Сибири (стоянка Мальта, 24 тыс. лет назад) и представителя культуры Кловис из Западной Монтаны (12,6 тыс. лет назад) (Clemente et al., 2014). Однако «арктический» вариант был обнаружен в гетерозиготном состоянии в геноме палеоэскимоса – представителя культуры Саккак из Гренландии (4 тыс. лет назад), а также с частотой примерно 50 % у канадских и гренландских эскимосов, представляющих древнеэскимосскую культуру Дорсет

(начало I тыс. до н. э. – начало II тыс. н. э.). Таким образом, «арктическая» мутация гена *CPT1A* распространялась среди коренного населения Арктического региона как минимум на протяжении последних четырех тысячелетий, хотя результаты молекулярного датирования дают более широкий диапазон ее появления: от 6 до 23 тыс. лет (Clemente et al., 2014).

Поскольку, как уже отмечалось выше, распространенность мутации G > A в локусе rs80356779 гена *CPT1A* в различных популяциях современного коренного населения Сибири и Восточной Азии практически неизвестна, в настоящем сообщении приводятся первые результаты популяционного скрининга этого генетического варианта у чукчей, коряков, эвенов, эвенков, якутов, бурят, алтайцев и корейцев.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила тотальная ДНК, выделенная из биологических тканей (кровь, волосные луковицы), полученных от 416 представителей восьми этнических групп Сибири и Восточной Азии. В ходе экспедиций собраны образцы крови чукчей ($N = 15$) (г. Анадырь, Чукотский автономный округ), коряков ($N = 58$) и эвенов ($N = 72$) (Северо-Эвенский район Магаданской области). Выборка западных эвенков ($N = 54$) сформирована из населения различных поселков Эвенкийского автономного округа. В выборку якутов ($N = 27$) включены жители поселков Республики Саха (Якутия). Выборку бурят ($N = 55$) составили жители населенных пунктов Республики Бурятия. Выборка алтайцев ($N = 49$) сформирована из представителей субэтнических групп алтайцев Республики Алтай. Выборка корейцев ($N = 71$) представлена жителями разных провинций Республики Корея.

Нуклеотидную последовательность гена *CPT1A*, включающую в свой состав локус rs80356779 (полиморфизм G > A), амплифицировали с помощью пары олигонуклеотидных праймеров CPT1L (5'-AGGTGCAAAGTG AATTAGTC-3') и CPT1R (5'-CAGCACATAAGGGATAG TTT-3') или пары праймеров CPT2L (5'-GTCCTGTTTG TACTTTCACC-3') и CPT2R (5'-GGATGCCTTTAATCTA GTGA-3'). Они были подобраны с помощью анализа нуклеотидной последовательности гена *CPT1A* (под номером NC_000011.10 в базе данных GenBank) с использованием программы Primer3 (Untergasser et al., 2012). Участки ДНК амплифицировали в течение 35 циклов в температурном режиме: 94 °C – 30 с, 50 °C – 60 с и 72 °C – 60 с. Продукты амплификации секвенировали с использованием набора для циклического секвенирования ДНК Big Dye Terminator (Applied Biosystems v. 3.1) и генетического анализатора ABI Prism 3500xL (Applied Biosystems, США). Для выравнивания и анализа нуклеотидных последовательностей использовали программы пакета MEGA5 (Tamura et al., 2011). Частоту аллелей, гетерозиготность и соответствие распределения генотипов равновесию Харди – Вайнберга рассчитывали с помощью пакета программ Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2007).

Секвенирование экзонов и прилегающих нетранслируемых участков генов проводили с помощью системы Agilent SureSelectXT Human All Exon V5+UTRs (Agilent Technologies) на платформе HiSeq 1500 (Illumina, США)

для шести образцов ДНК от представителей коренного населения Сибири (три коряка, два эвены и один эвенк). В качестве референтной последовательности использовали геномную сборку GRCh37.p13. Аннотацию вариантов полиморфизма осуществляли с помощью сервера SeattleSeq Annotation. Для выявления гаплотипов из генотипов с неизвестной гаметной фазой применяли алгоритм ELB (Excoffier et al., 2003) пакета программ Arlequin 3.01.

Результаты и обсуждение

Впервые среди коренного населения Сибири (у чукчей, коряков, эвенов, эвенков, якутов, бурят и алтайцев) и Восточной Азии (корейцев) проведен популяционный скрининг частоты нуклеотидной замены $G > A$ в локусе rs80356779 гена *CPT1A*. Эта нуклеотидная замена приводит к аминокислотной замене пролина на лейцин в позиции 479 (вариант P479L). Аллель A обнаружен с высокой частотой в береговых популяциях Северо-Востока Азии – 66 % у коряков, 56 % у чукчей и 30 % у эвенов, а также в единичном случае (частота 1 %) у эвенков Центральной Сибири (табл. 1).

Ранее было установлено, что аллель A широко распространен среди эскимосов Северной Америки и Гренландии, однако причины отбора в пользу этого генетического варианта не были установлены, хотя предполагался адаптивный сценарий (табл. 2). Как видно из табл. 2, достоверные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга наблюдаются только в больших выборках (более 400 человек) эскимосов Аляски и Канады ($p < 0,05$), хотя во всех популяциях Арктического региона (у эскимосов, чукчей и коряков) с высокой частотой распространены аллель A и гомозиготы AA. Во всех этих популяциях уровень наблюдаемой гетерозиготности ниже ожидаемой, что указывает на возможность отклонения от равновесного распределения частот генотипов в арктических популяциях. По всей видимости, величины отклонений могут стать достоверными при расширении выборок из этих популяций. У эвенов нами также зарегистрирована довольно высокая частота аллеля A (30 %), но при низкой частоте гомозигот AA и в условиях соблюдения равновесия Харди–Вайнберга.

Ранее было установлено, что локус rs80356779 гена *CPT1A* находится под воздействием отбора с очень высоким коэффициентом селекции ($s = 0,14$) (Clemente et al., 2014). Таким образом, сохранению высокой частоты аллеля A и гомозигот AA в ряде арктических популяций, несомненно, способствует направленный отбор в пользу этих генетических вариантов. Между тем появление аллеля A у эвенов и тем более единичный случай у эвенков, по всей видимости, связаны с межэтническими контактами, хотя и не исключено, что появление аллеля A у эвенка может быть связано и с независимым происхождением этого варианта полиморфизма. В случае независимого происхождения аллеля A у эвенка ожидается, что гаплотипы, основанные на нескольких SNP, фланкирующих исследуемый вариант rs80356779, у эвенков и береговых популяций Чукотки и Приохотья будут различаться.

Для проверки этого предположения нами проанализирован полиморфизм гена *CPT1A* у коряков и эвенов – носи-

телей гомозигот AA, а также у эвенка – гетерозиготы GA. Анализ полиморфизма, выявленного с помощью высокопроизводительного секвенирования, показал, что, помимо исследуемого локуса rs80356779, еще пять полиморфных локусов являются информативными в плане выяснения структуры гаплотипов гена *CPT1A* – rs2278908, rs2278907, rs2924699, rs7112615 и rs2229738. Эти маркеры расположены в участке длиной 38418 пар нуклеотидов. Из них только rs2229738 находится в экзоне, остальные локусы относятся к интронным участкам. Для выявления как можно большего разнообразия генотипов для шести указанных маркеров нами проанализированы данные об изменчивости гена *CPT1A* в выборках коренного населения Сибири (25 человек) по результатам работы F.J. Clemente с коллегами (2014), и населения Восточной Азии (25 человек) и Европы (11 человек) по данным проекта «1 000 Genomes» (www.1000genomes.org). В итоге было выявлено 11 генотипов, из которых два были встречены в Европе, шесть – в Сибири и Восточной Азии, три – в Евразии в целом (табл. 3).

Фазирование генотипов с помощью алгоритма ELB (Excoffier et al., 2003) позволило выявить восемь гаплотипов гена *CPT1A* (см. табл. 3). Из них два гаплотипа были обнаружены как в сибирских и восточноазиатских, так и в европейских популяциях (ht2 и ht6), один гаплотип (ht1), маркированный заменой $G > A$ в локусе rs80356779, характерен только для северо-восточноазиатских популяций, три гаплотипа были зарегистрированы в Восточной Азии и Европе (ht4, ht5 и ht8) и по одному гаплотипу – в Восточной Азии (ht7) и Европе (ht3). Очевидно, что «арктическая» мутация в гаплотипе ht1 произошла неоднократно на базе гаплотипа ht6. Так как генотип эвенка (№ 4 в табл. 3) представлен гаплотипами ht1 и ht2, то это свидетельствует в пользу его гибридного происхождения.

Относительно географического происхождения «арктической» мутации в гене *CPT1A* было показано, что она возникла, вероятнее всего, среди предков эскимосов (Clemente et al., 2014). Согласно этнологическим данным, эскимосы выделились из эскалеутской общности, локализованной исконно в зоне Берингова пролива, примерно в IV–II тыс. до н.э., но лишь с начала I тыс. н.э. этногенез и этническая история азиатских эскимосов тесно переплетаются с историей чукчей и коряков (Народы Северо-Востока Сибири, 2010). Предполагается, что эскимосы в далеком прошлом жили по восточному берегу Камчатки и даже на побережье Охотского моря. Главными продуктами питания эскимосов издревле были мясо и жир ластоногих и китов, и поэтому именно эскимосы были основателями культуры морского зверобойного промысла (Вдовин, 1973). Коряки же изначально формировались в континентальных условиях Севера и занимались главным образом охотой на дикого северного оленя. В середине II тыс. до н.э. в Северном Приохотье возникла токаревская культура, которая дала начало береговым корякам. Осваивая тихоокеанское побережье, коряки одну часть эскимосов ассимилировали, другую вытеснили с побережья. От эскимосов коряки усвоили основы культуры морского зверобойного промысла (Вдовин, 1973). К середине I тыс. до н.э. в северной части Охотского моря получает развитие новая древнекорякская

Table 1. Distribution of frequencies of genotypes and alleles for locus rs80356779 of the *CPT1A* gene in populations of Siberia and Eastern Asia

Population	N	Genotypes			Alleles		Ho	He	HWE, <i>p</i>
		GG	GA	AA	G	A			
Koryaks	58	0.16	0.38	0.47	0.34	0.66	0.379	0.456	0.25
Chukchi	15	0.2	0.47	0.33	0.43	0.56	0.467	0.508	1.0
Evens	72	0.5	0.42	0.08	0.7	0.3	0.417	0.416	1.0
Evenks	54	0.98	0.02	0	0.99	0.01	0.19	0.019	1.0
Yakuts	27	1.0	0	0	1.0	0	0	0	1.0
Altaians	49	1.0	0	0	1.0	0	0	0	1.0
Buryats	55	1.0	0	0	1.0	0	0	0	1.0
Koreans	71	1.0	0	0	1.0	0	0	0	1.0

Note: Here and in Table 2: *N*, sample size; *Ho* и *He*, observed and expected heterozygosity, respectively; HWE, *p*, statistical significance of deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (significant at *p* < 0.05).

Table 2. Distribution of frequencies of genotypes and alleles for locus rs80356779 of *CPT1A* gene in some populations based on literature sources

Population	N	Genotypes			Alleles		Ho	He	HWE, <i>p</i>	References
		GG	GA	AA	G	A				
Alaskan Eskimo	1075	0.04	0.25	0.71	0.17	0.83	0.253	0.279	0.004	Lemas et al., 2012
Canadian Eskimo	422	0.06	0.24	0.7	0.18	0.82	0.244	0.297	0.001	Greenberg et al., 2009
Grenlandic Eskimo	1111	0.08	0.38	0.54	0.27	0.73	0.379	0.394	0.22	Rajakumar et al., 2009
Canadian Eskimo	50	0.02	5	44	0.07	0.93	0.1	0.132	0.2	Rajakumar et al., 2009
Chinese (Canada)	95	1.0	0	0	1.0	0	0	0	1.0	Rajakumar et al., 2009
Europeoids (Canada)	95	1.0	0	0	1.0	0	0	0	1.0	Rajakumar et al., 2009

Table 3. Genotypes and haplotypes of the *CPT1A* gene in populations of Siberia, Eastern Asia, and Europe

Number	Genotype	Number	Haplotype	Prevalent in
1	CACAAC	ht1	CACAAC	Siberia
		ht1	CACAAC	
2	CACARC	ht1	CACAAC	Siberia
		ht6	CACAGC	
3	CACAGC	ht6	CACAGC	Siberia, Eastern Asia, Europe
		ht6	CACAGC	
4	YRYMRY	ht1	CACAAC	Siberia
		ht2	TGTCGT	
5	CACAGY	ht6	CACAGC	Eastern Asia
		ht4	CACAGT	
6	YRCAGT	ht3	TGCAGT	Europe
		ht4	CACAGT	
7	YRCAGC	ht5	TGCAGC	Eastern Asia, Europe
		ht6	CACAGC	
8	CAYMGC	ht7	CATCGC	Eastern Asia
		ht6	CACAGC	
9	YRYMGY	ht6	CACAGC	Eastern Asia
		ht2	TGTCGT	
10	YRYMGC	ht8	TGTCGC	Eastern Asia, Europe
		ht6	CACAGC	
11	YRYMGT	ht2	TGTCGT	Europe
		ht4	CACAGT	

Note: Loci are ordered in genotypes and haplotypes as follows: rs2278908, rs2278907, rs2924699, rs7112615, rs80356779, and rs2229738.

культура – охотская. Эта культура имеет четкую ориентацию на морской зверобойный промысел и приморское собирательство (Васильевский, 1971). Значительная часть терминов, связанных с морским зверобойным промыслом у коряков, – эскимосского происхождения.

Чукотско-эскимосские этнические связи прослеживаются с I тыс. н.э. Береговые чукчи и эскимосы – типичные представители берингоморского типа арктической расы. Часть эскимосов была ассимилирована чукчами, так как последние были более многочисленны. Лишь часть чукчей постепенно стала совмещать сухопутную охоту с морским промыслом, и произошло это не ранее начала нашей эры (Народы Северо-Востока Сибири, 2010).

Таким образом, данные этнологии показывают, что распространению «арктической» мутации в гене *CPT1A* среди коренного населения Крайнего Севера, скорее всего, способствовали процессы ассимиляции эскимосов чукчами и коряками в связи с экспансией последних на прибрежные территории Северо-Востока Азии. В отношении эвенов следует отметить, что проникновение тунгусов на Охотское побережье относят к XV–XVI вв., поэтому появление «арктической» мутации в генофонде эвенов, по-видимому, обусловлено контактами с коряками, с которыми эвены соседствуют до сих пор.

Среди американских эскимосов – носителей «арктической» мутации в гомозиготном состоянии – выявлены случаи заболеваний, связанных с дефицитом фермента *CPT1A* и, как следствие, с гипокетонной гипогликемией и синдромом внезапной детской смерти (Greenberg et al., 2009). Поэтому вполне возможно, что полезная в прошлом мутация, позволившая населению Крайнего Севера Азии и Америки выживать в условиях углеводного голодания, стала вредной в наше время, когда наблюдается тенденция к отходу от традиционного питания. Пример «арктической» мутации в гене *CPT1A* демонстрирует, как дисбаланс в питании (т.е. при выраженном преобладании липидов и белков) первых жителей Арктики стал причиной фиксации таких генных вариантов, которые позволили смягчить проявление метаболических издержек потребления жирной пищи (например, снизить уровень кетоза) и приобрести полезные модификации сердечно-сосудистой системы. Очевидно, что такого рода генетическая система является очень сложной генной сетью, элементы которой еще предстоит реконструировать.

Acknowledgments

This study was supported by the RAS Presidium program of fundamental studies “Pilot basic research for the development of the Arctic Russian Federation”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bat'yanova E.P., Turaev V.A. (Eds.) *Narody Severo-Vostoka Sibiri. [Peoples of North-East Siberia]*. Moscow, Nauka Publ., 2010. (in Russian)
- Cardona A., Pagani L., Antao T., Lawson D.J., Eichstaedt C.A., Yngvadottir B., Shwe M.T.T., Wee J., Romero I.G., Raj S., Metspalu M., Vilems R., Willerslev E., Tyler-Smith C., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Kivisild T. Genome-wide analysis of cold adaption in indigenous Siberian populations. *PLoS ONE*. 2014;9:e98076. DOI 10.1371/journal.pone.0098076.
- Clemente F.J., Cardona A., Inchley C.E., Peter B.M., Jacobs G., Pagani L., Lawson D.J., Antao T., Vicente M., Mitt M., DeGiorgio M., Faltyskova Z., Xue Y., Ayub Q., Szpak M., Mägi R., Eriksson A., Manica A., Raghavan M., Rasmussen M., Rasmussen S., Willerslev E., Vidal-Puig A., Tyler-Smith C., Vilems R., Nielsen R., Metspalu M., Malyarchuk B., Derenko M., Kivisild T. A selective sweep on a deleterious mutation in the *CPT1A* gene in Arctic populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2014;95:584-589. DOI 10.1016/j.ajhg.2014.09.016.
- Excoffier L., Laval G., Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum. Genomics*. 2003;1:7-19. DOI 10.1186/1479-7364-1-1-7.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*. 2007;1:47-50.
- Greenberg C.R., Dilling L.A., Thompson G.R., Seargeant L.E., Haworth J.C., Phillips S., Chan A., Vallance H.D., Waters P.J., Sinclair G., Lillquist Y., Wanders R.J., Olpin S.E. *Mol. Genet. Metab.* 2009;96:201-207. DOI 10.1016/j.ymgme.2008.12.018.
- Lemas D.J., Wiener H.W., O'Brien D.M., Hopkins S., Stanhope K.L., Havel P.J., Allison D.B., Fernandez J.R., Tiwari H.K., Boyer B.B. Genetic polymorphisms in carnitine palmitoyltransferase 1A gene are associated with variation in body composition and fasting lipid traits in Yup'ik Eskimos. *J. Lipid Res.* 2012;53:175-184. DOI 10.1194/jlr.P018952.
- Rajakumar C., Ban M.R., Cao H., Young T.K., Bjerregaard P., Hegele R.A. Carnitine palmitoyltransferase 1A polymorphism P479L is common in Greenland Inuit and is associated with elevated plasma apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 2009;50:1223-1228. DOI 10.1194/jlr.P900001-JLR200.
- Tamura K., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011;28:2731-2739. DOI 10.1093/molbev/msr121.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e115. DOI 10.1093/nar/gks596.
- Vasilievsky R.S. *Proiskhozhdenie i drevnyaya kul'tura koryakov [Origin and Ancient Culture of Koryaks]*. Novosibirsk, Nauka Publ., 1971. (in Russian)
- Vdovin I.S. *Ocherki etnicheskoy istorii koryakov [Essays on the Ethnic History of Koryaks]*. Leningrad, Nauka Publ., 1973. (in Russian)

Генетические маркеры в мясном овцеводстве

А.В. Дейкин¹✉, М.И. Селионова², А.Ю. Криворучко³, Д.В. Коваленко², В.И. Трухачев³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства», Ставрополь, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ставропольский государственный аграрный университет», Ставрополь, Россия

Мясное животноводство, в том числе овцеводство, – важная отрасль сельского хозяйства. Повышение производительности и улучшение качества мяса рассматриваются сегодня как приоритеты развития отрасли. В последнее время значительные результаты в мясном овцеводстве получены благодаря использованию достижений генетики. В селекционных программах обычно отбирали производителей на основании качества потомства, родственных или предков. В то же время применение молекулярно-генетической технологии может вывести такие работы на новый методический уровень. На сегодняшний день все еще нерешенной остается проблема установления достоверной связи между признаками продуктивности и генетическими маркерами, поскольку в отличие, например, от моногенных заболеваний, признаки продуктивности обладают комплексным характером и их проявление зависит от баланса между различными физиологическими функциями, нарушение в котором, даже при кажущейся положительной роли преобладающего элемента, может привести к снижению продуктивности в целом. Селекция на основе генетических маркеров продуктивности направлена на работу с животными с высоким генетическим потенциалом по приросту живой массы и качеству мяса. В обзоре описаны перспективные гены – потенциальные маркеры продуктивности в мясном овцеводстве. Подробно рассмотрено использование гена гормона роста, каллипинии, кальпаина и кальпастатина в качестве перспективных генетических маркеров для селекции овец. Вместе с тем необходимо констатировать, что, несмотря на многочисленные сообщения о потенциальных генетических маркерах продуктивности, заметного влияния на повышение экономических показателей в овцеводстве молекулярно-генетические методы пока не оказали.

Ключевые слова: генетические маркеры продуктивности; гормон роста; каллипиния; кальпаин; кальпастатин.

Genetic markers in sheep meat breeding

A.V. Deykin¹✉, M.I. Selionova², A.Yu. Krivoruchko³, D.V. Kovalenko², V.I. Truhachev³

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² All-Russian Scientific Research Institute of Sheep and Goat Breeding, Stavropol, Russia

³ Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia

Cattle breeding, including sheep farming, is an important sector of agriculture. Increasing productivity and improving meat quality are considered today as the priorities in the industry. Significant advances have been achieved in sheep breeding through the use of genetics. The commonplace of all selection programs is using manufacturers selected on the basis of the quality of the offspring, relatives or ancestors. At the same time, using the achievements of molecular genetics can lead breeding to a new methodological level. The problem of finding reliable communication between productivity features and genetic markers has not yet been solved, because productivity is a set of features (unlike, for example, monogenic diseases) and its expression depends on the balance between various physiological functions. By contrast, imbalance may cause reduced productivity as a whole even if there is a positive role of prevailing element. Selection on the basis of genetic markers of productivity aims to work with animals with high genetic potential for weight gain and meat quality. This review considers promising genes – potential markers of productivity in sheep farming, such as growth hormone gene, callipyge, calpain and calpastatin, which have promise as genetic markers for sheep selection. However, it should be stated that in spite of numerous reports about potential genetic markers of productivity there is still no data about the influence of molecular genetic methods on improving the economic performance of sheep selection.

Key words: genetic markers of productivity; growth hormone; callipyge phenotype; calpain; calpastatin.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дейкин А.В., Селионова М.И., Криворучко А.Ю., Коваленко Д.В., Трухачев В.И. Генетические маркеры в мясном овцеводстве. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):576-583. DOI 10.18699/VJ16.139

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Deykin A.V., Selionova M.I., Krivoruchko A.Yu., Kovalenko D.V., Truhachev V.I. Genetic markers in sheep meat breeding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):576-583. DOI 10.18699/VJ16.139

REVIEW

Received 18.06.2015

Accepted for publication 29.01.2016

Online 26.04.2016

© AUTHORS, 2016



e-mail: deikin@igb.ac.ru

Технология, основанная на применении ДНК-маркеров, рассматривается как основной подход, позволяющий значительно ускорить процесс накопления генов, несущих желательные признаки по продуктивности, в особенности когда речь идет о признаках, которые трудно или дорого измерить, и тех, которые проявляются в позднейших стадиях жизни животных, а значит – повысить продуктивность и экономическую рентабельность мясного овцеводства. Маркерами в этом случае могут быть ДНК-последовательности, характеризующие: 1) различные аллельные варианты генов мясной продуктивности (к этой группе относятся дупликации, инсерции, протяженные делеции и др.); 2) точки SNP (single nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм), которые могут находиться в экзонах, интронах или регуляторных областях генов, но в любом случае оказывают достоверное влияние на проявление хозяйственно значимых признаков животного; 3) делеции/вставки нуклеотидов, приводящие к изменению хозяйственно значимых признаков животного.

Большинство показателей продуктивности животноводства являются комплексными, зависящими от суммарного действия значительного числа генов, каждый из которых играет небольшую роль, а также от взаимодействия между генами, при этом способность животного проявить генетический потенциал определяется и воздействием факторов окружающей среды.

В последнее время внимание исследователей было сосредоточено на геномной селекции (или селекции целостного генома), направленной на вычисление суммирующего воздействия многих генов, а также возможного эпистатического эффекта (Goddard, Hayes, 2007; Gardner et al., 2010). Данный подход, безусловно, перспективен, и в будущем именно на нем будут основаны селекция и ветеринария. Ограничением метода сегодня является непонимание принципов работы генома и фактических механизмов реализации в том или ином виде мультигенных признаков. Классическая селекция может использовать данные полногеномного анализа, но только как справочный материал, решения же до сих пор принимаются на основе анализа фенотипа.

Прорывным направлением в геномном анализе является применение на большом количестве животных (в таких исследованиях должны быть задействованы сотни тысяч животных) SNP-чипов (Phua et al., 2014), которые позволяют соотносить фенотипические признаки с наличием или отсутствием в геноме конкретных SNP, что, в свою очередь, позволяет создать базу данных для оценки важности каждого из исследованных SNP.

К сожалению, до сих пор темпы открытия новых точечных мутаций, влияющих на проявление хозяйственно значимых признаков, были незначительными. Это связано с:

- 1) невозможностью достаточно эффективно вычленить большие регионы генома, идентифицированные как содержащие значимые нуклеотидные замены;
- 2) как правило, малоэффективным значением большинства значимых нуклеотидных замен;
- 3) трудностью получения статистически достоверных данных о влиянии конкретной нуклеотидной замены;

4) отсутствием до недавнего времени секвенированного и аннотированного генома для большинства домашних животных. Геном крупного рогатого скота (КРС) был секвенирован в 2009 г. (The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, 2009), а геном овцы – в 2012 г. (The International Sheep Genomics Consortium, 2010).

Сочетание расшифрованного генома с высокоплотным SNP-чипом дает возможность значительно ускорить поиск значимого генетического полиморфизма, в том числе по мясной продуктивности. Несмотря на указанные выше ограничения, открыто несколько генетических вариантов с относительно большим воздействием на признаки мясистости. Более того, были выявлены новые молекулярно-биологические и биохимические механизмы, ассоциированные с этими генетическими вариантами. Некоторыми авторами подробно рассмотрен также вопрос изменения вкусовых качеств мяса животных, характеризующихся повышенной мясистостью (Warner et al., 2010; Hopkins et al., 2011; Lambe et al., 2011).

Скелетная мускулатура: строение и функции

Для понимания воздействия генетической вариативности, оказывающей влияние на скелетную мускулатуру, важно учитывать ее нормальное функционирование и особенности развития. Скелетная мускулатура отвечает своим функциям. Мышцы, к которым окружающая среда предъявляет требования сокращаться медленно на протяжении длительного времени, такие как постуральные (связанные с осанкой животного), характеризуются преобладанием в своем составе «медленных» мышечных волокон (волокон типа I). Они медленно устают, и основной тип их метаболизма – оксидативный. Клетки, составляющие эти мышцы, изобилуют митохондриями и имеют красноватый цвет.

Напротив, в мышцах, сокращающихся быстро, со значительной силой, таких как некоторые локомоторные мышцы, в большем количестве содержатся «быстрые» волокна (тип IIb и IIx). Работа этих мышц в значительной степени зависит от анаэробного гликолитического типа метаболизма. Они более белого цвета, и составляющие их клетки содержат меньше митохондрий (MacIntosh et al., 2006). Количество и тип мышечных волокон определяются на ранних и средних этапах развития плода. На поздних сроках развития плода и в период быстрого постнатального развития происходит повсеместная гипертрофия мышечных волокон за счет слияния одноядерных сателлитных клеток с многоядерными миофибриллами (MacIntosh et al., 2006).

Сателлитные клетки располагаются между сарколеммой и базальной мембраной миофибрилл и в зрелых мышцах обычно находятся в состоянии покоя, но при травмировании мышцы начинают пролиферировать и сливаться с миофибриллами, обеспечивая, таким образом, заживление мышечной ткани. Мышечные волокна составляют высокоорганизованные белки – в основном полимерный актин, миозин и сопутствующие им белки (MacIntosh et al., 2006; Tellam et al., 2012). Происходящий вследствие родов переход жвачных животных организмов из внутриутробной среды во внешнюю окружающую среду связан со значительными физиологическими изменениями.

Genes that affect the fleshiness of sheep

Gene or locus associated with a phenotype	Phenotypic manifestation	Reference
Myostatin (<i>MSTN</i>)	Increases muscle growth and reduces fat deposition	Clop et al., 2006; Johnson et al., 2009; Boman et al., 2010; Masri et al., 2011a, b
Callipyge phenotype (<i>CLPG</i>)	Increases the size of the caudal muscle and leanness and improves stiffness	Byrne et al., 2010; Caiment et al., 2010; Everts et al., 2010; Warner et al., 2010; Bi, Kuang, 2012; Sun et al., 2012; Tellam et al., 2012
<i>Carwell</i> , <i>LoinMax</i>	Thickens muscles without affecting the deposition of fat, possible changes in the shape of muscles, a shift toward the predominance of muscle IIb and IIx fibers	Greenwood et al., 2006; Nicol et al., 2009; Masri et al., 2010
Texel Muscling QTL (TM-QTL)	Increases loin meatiness	Walling et al., 2004; Rius-Vilarrasa et al., 2009; Matika et al., 2011; Macfarlane et al., 2014
<i>Xinjiang</i>	Increases meatiness	Liu et al., 2006
OAR1 QTL	Увеличивает размеры мышц или живой вес	Walling et al., 2004; McRae et al., 2005; Matika et al., 2011
Growth Hormone (<i>GH</i>)	Overexpression of the <i>GH</i> gene leads to accelerated growth and development of the animal	Piper et al., 2001
Calpain (<i>CAPN1</i>)	Muscle growth and meat with a delicate texture after slaughter	Sazili et al., 2004
Calpastatin (<i>CAST</i>)	Performance marker for weight gain and meat quality	Whipple et al., 1990; Shackelford et al., 1991a, b; Koohmaraie, 1992; Palmer et al., 1999

Скелетная мускулатура должна быстро приспособиться к воздействию на организм силы тяжести (постуральная поддержка), а также начать обеспечивать локомоторную функцию, и все это происходит на фоне смены источников энергии, использовавшихся во внутриутробной среде, на новые. Эти приспособительные механизмы чрезвычайно важны для новорожденных жвачных животных, которым требуется стоять, ходить и бегать уже через несколько часов после рождения.

Скелетная мускулатура овец претерпевает на поздних сроках внутриутробного развития изменения, которые приводят к тому, что у новорожденных она становится максимально схожей со скелетной мускулатурой взрослых, в том числе и по типу мышечных волокон (Вугне et al., 2010). Скелетная мускулатура проходит развитие согласно сложной и трудной программе, обеспечивающей способность соответствовать изменившейся среде и ее новым сигналам. Мутации, оказывающие влияние на мускулистость (мясистость), т.е. утолщение мышц в соответствии с параметрами скелета, как правило, изменяют траекторию описанной программы развития и меняют число, состав мышечных волокон, а также их гипертрофию. Было выявлено множество мутаций, повышающих мускулистость и оказывающих действие на описанную программу развития посредством новых механизмов (Zhang et al., 2013). Эти мутации представляют собой адекватные модели для изучения формирования и функций мышц (таблица).

Рассматривая селекцию на основе генетических маркеров как способ повышения продуктивности мясного овцеводства, нельзя забывать об уже известных мутациях

генов, связанных с пороками или заболеваниями животных, поскольку больное животное не сможет реализовать даже самую перспективную генетическую программу по мясистости. Среди жвачных лучше всего изучены такие гены у крупного рогатого скота, менее охарактеризованы овцы и слабо исследованы козы. В базе данных генов наследственных заболеваний домашних животных (Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA) актуально на апрель 2014 г. <http://omia.angis.org.au/>) количество известных генных вариантов с идентифицированными мутациями для крупного рогатого скота (93) почти в два раза выше, чем для овец (44), и в десять раз, чем для коз (8). В этой базе данных систематизированы также варианты генов, меняющих фенотип, в том числе пороков, предрасположенностей к заболеваниям, производственных черт и окрасов.

Поскольку генетических маркеров продуктивности в овцеводстве достаточно много, обнаружено более 50 целевых генов. Далее мы подробно рассмотрим гены, по которым есть сведения о полиморфизме, влияющем на мясную продуктивность в экспериментах на больших группах животных и представляющем наиболее яркий фенотип.

Гормон роста

Полноценный рост и развитие плода зависят от правильного взаимодействия с матерью через плаценту – орган, с помощью которого эмбрион получает питательные вещества, кислород и выводятся продукты метаболизма. Кроме того, плацента является эндокринным органом, который синтезирует широкий спектр стероидных и пептидных

гормонов, регулирующих развитие фетоплацентарной единицы и изменяющих материнскую физиологию для поддержания беременности (Gootwine, Rozov, 2006; Murphy et al., 2006).

Плацента многих видов животных, включая человека, приматов, грызунов и жвачных животных, выделяет гормоны, структурно связанные с гипофизом: гормон роста (*GH*) и пролактин (Anthony et al., 1995; Lacroix et al., 1996; Soares, 2004). У человека дублированные копии гена *GH* – *GH-N* и *GH-V* – отличаются по 13 аминокислотам (Lacroix et al., 2002): ген *GH-N* экспрессируется преимущественно в гипофизе, а ген *GH-V* – в плаценте (Chen et al., 1989). Продукты двух копий гена имеют аналогичную аффинность к рецептору *GH* (*GHR*) и схожую соматогенную активность, но оказывают разное действие на лактацию (Ray et al., 1990; Solomon et al., 2006). Дублированный ген *GH* обнаружен и в геноме овец (Valinsky et al., 1990; Gootwine et al., 1993). В отличие от человека, у которого нет аллеля с одной копией гена (вариант без дубликации), у овец обнаружен полиморфный для дублирования *GH* в форме двух аллелей, сегрегирующих в популяции: *GH1* с одной копией *GH-N* и *GH2*, содержащий как *GH2-N*, так и генные копии *GH2-Z*. Зрелые продукты этих двух копий гена отличаются по двум аминокислотам (Ofir, Gootwine, 1997): одна замена в положении 9, в зоне второго рецептор-связывающего сайта молекулы *GH* (Gly заменен на Arg), другая – в положении 63, в составе первого сайта связывания (Gly заменен на Ser по аналогии с белком человека *GH* (Kossiakoff, 2004)).

Примерно с 27 по 75-й день беременности трофэктодерма и синцитиальные клетки плаценты овец содержат мРНК, которая включает два типа транскриптов, представляющих продукты генов *GH2-N* и *GH2-Z* (Lacroix et al., 1996, 1999). Неизвестно, имеют ли эти продукты сходную биологическую активность. Предполагалось (Wallis et al., 1998), что в то время как замещение аминокислот Gly → Arg в положении 9 может усилить сродство продукта гена копии *GH2-Z* к рецептору овечьего *GH* (*oGHR*), Gly → Ser в положении 63 может препятствовать связыванию с рецептором, что может привести к антагонистической активности между продуктами дублированных копий.

Роль копии *GH-Z* во время беременности еще не ясна. Результаты недавних исследований (Reicher et al., 2010) не подтверждают предположение об антагонистическом действии копии *GH2-Z* на активность *oGH* (гормон роста овец), высказывавшееся ранее (Wallis et al., 1998). Напротив, белок с двойной заменой G9R/G63S усиливает сродство к рецептору и проявляет большую биологическую активность по отношению к белку аллеля *GH-N*, что может быть результатом комбинированного воздействия каждой из мутаций (G9R и G63S). Действительно, комплексный мутационный анализ молекулы *hGH* (гормон роста человека) (Walsh et al., 2004) показал аллостерическую связь между первым и вторым сайтами связывания молекулы *hGH*, что влияет на кинетику рецепторов гомодимеризации.

Экспрессия гена, продукт которого характеризуется более высоким связыванием и биологической активностью, может улучшить *GH*-зависимые плацентарные функции,

давая преимущество плоду, имеющему дублированный ген. Действительно, плацентарный продукт копии гена *GH-V* имеет преимущество над продуктом гипофиза *GH-N* в стимулировании клеток трофобластов человека в экспериментальной модели (Lacroix et al., 2005; Reicher et al., 2008), что свидетельствует о специфической роли для этого тканеспецифического *GH* варианта в поддержании беременности. В экспериментах на трансгенных животных показано, что суперэкспрессия гена *GH* приводит к ускоренному росту и развитию организма животного (Piper et al., 2001). Следовательно, можно ожидать, что изменения в уровне экспрессии или структуре гена могут приводить к как положительным, так и отрицательным эффектам на хозяйственно значимые признаки, в том числе на прирост живой массы.

Каллипиягия

Фенотипически у овец мутация callipyge – *CLPG* (callipygemuscle hypertrophy gen) проявляется мускульной гипертрофией, в первую очередь, в области таза и задних конечностей (Koohmaraie et al., 1995; Jackson et al., 1997a; Cockett et al., 2005). Мышцы у таких ягнят увеличены в разной степени, при этом гипертрофируются не все мышцы. Были подвергнуты сравнению 19 мышц, иссеченных у обычных и *CLPG* животных (Jackson et al., 1997b), общий вес иссеченных мускулов таза, торса и передних конечностей у ягнят с каллипиягией был больше, чем у обычных ягнят с одним общим родителем на 42, 50 и 14 % соответственно. Описываемая мышечная гипертрофия возникала после трехмесячного возраста (Jackson et al., 1997a), следовательно, для таких животных отсутствует повышенный риск возникновения дистоции. У овец с мутацией *CLPG* проявляются некоторые желательные хозяйственно значимые характеристики и свойства качества мяса: более высокий процент выхода мяса, большая филейная часть, мясо более постное, конечности их были оценены выше (Koohmaraie et al., 1995; Jackson et al., 1997c). Также у этих ягнят были лучше выражены (по сравнению с ягнятами обычной мускулистости) мясные формы цельных конечностей, филейной части, корейки на кости и лопаток на 11,8, 4,7, 2,5 и 2,3 % соответственно (Busboom et al., 1999). В дополнение к этому ягнята с каллипиягией были более продуктивными по мясу при меньшем ежедневном поглощении кормов (Jackson et al., 1997a), что проявлялось в снижении производственных затрат. Следовательно, широкое использование описываемых ягнят потенциально способно снизить стоимость молодой баранины для потребителей и повысить рентабельность овцеводства. К сожалению, отрицательным признаком, даже пороком, ягнят с каллипиягией является высокая жесткость мяса (Koohmaraie et al., 1995; Shackelford et al., 1997; Moore, Shimasaki, 2005). Повышенная мясистость *CLPG*-экспрессирующих животных происходит в основном за счет гипертрофии мышечных волокон. Гистологическое сравнение мышечных волокон (Carpenter et al., 1996) у животных, проявляющих каллипиягию, с нормальными мышечными волокнами показало, что у первых выявляются в среднем больший диаметр «быстрых» волокон как типа IIb, так и типа IIx и меньший диаметр «медленных» мышечных волокон. Помимо этого,

у *CLPG*-экспрессирующих овец процентное содержание мышечных волокон «быстрого» типа, использующих гликолиз, выше, чем «медленных» и «быстрых» волокон, имеющих оксидантно-гликолитический метаболизм. Таким образом, изменение в мышечной ткани у *CLPG*-экспрессирующих животных жестко ассоциировано с «быстрыми» волокнами, использующими гликолитический тип метаболизма, именно эти волокна и увеличиваются в диаметре и процентном отношении к другим типам мышечных волокон. Описываемая гипертрофия проявляется у ягнят с восьминедельного возраста, но не характерна для двухнедельных ягнят (Carpenter, Cockett, 2000), поэтому требуется обширное исследование постнатального развития овец с каллипигией.

Животные, экспрессирующие *CLPG*, представляют новый тип наследования, названный полярным супердоминированием (Cockett et al., 2005). Фенотип *CLPG* реализуется в потомстве, гетерозиготном по *CLPG*-мутации, причем указанный ген у этого потомства обязательно должен быть получен от отца (т. е. у потомков с генотипом $+M/CLPG$, где *M* и *P* обозначают наследование аллеля по материнской и отцовской линиям соответственно). Другие три возможных генотипа ($+M/+P$, $CLPGM/+P$ или $CLPGM/CLPG$) фенотипически нормальны.

Хотя гибридный дисгенез у *Drosophila* (Kidwell et al., 1977) и полярная летальность у мышей (Tomita, 1960) реализуются при наличии мутации в гетерозиготном состоянии, в зависимости от того был ли унаследован аллель от отца или матери, каллипигия у овец служит единственным известным на сегодня примером строгого полярного супердоминирования. Модель полярного супердоминирования для фенотипа каллипигии у овец была подтверждена в исследованиях на различных, не связанных друг с другом стадах (Freking et al., 2002), тем самым продемонстрировано, что полярное супердоминирование *CLPG*-мутации у овец представляет собой новый тип наследования. Недавно получены результаты длившегося десятилетия позиционального клонирования, имевшего своей целью идентифицировать *CLPG*-мутацию: была обнаружена точка *SNP*^{*CLPG*} *A*->-*G*, которая и определяет возникновение аллеля *CLPG* (Freking et al., 2002; Smit et al., 2003). Этот полиморфный участок, который обозначают как *SNP*^{*CLPG*}, расположен внутри консервативной *12-bp* последовательности. Баран, у которого впервые произошла мутация, характерная для признака каллипигии, был мозаичен по этой мутации (Smit et al., 2003), но передавал ее потомкам.

Массовое исследование животных в российских хозяйствах позволит идентифицировать животных, содержащих такую мутацию, но не проявляющих соответствующий фенотип, если такие животные в популяции есть.

Кальпаин

В 1976 г. был изучен первый белок семейства кальпаинов (calpain), участвующий в декомпозиции мяса, происходящей после забоя животного. Система кальпаина представляет собой комплекс протеолитических и цитолитических белков. Эта система включает в себя кальций-зависимую протеазу, играющую значительную роль в росте мышц и получении мяса нежной текстуры после забоя (Sazili et al.,

2004). Кальпаины считаются иницирующим фактором декомпозиции мышечных волокон. Вообще ферменты кальпаина у живых овец регулируют рост мышц, влияя на декомпозицию мышечных волокон. После забоя ферменты кальпаина делают мясо более нежным за счет декомпозиции *Z*-дисков скелетной мускулатуры и ослабления связей между мышечными волокнами. Активность кальпаина зависит от Ca^{+2} , а протеолиз мышечных волокон, осуществляемый этой системой, обеспечивает более нежную текстуру мяса после забоя (Sazili et al., 2004). Различают два типа кальпаинов, каждый из которых является гетеродимером и содержит в своем составе общие субъединицы *K30* и сильно различающиеся субъединицы *K80*. Кальпаин *A* (μ -кальпаин) максимально активируется при концентрации ионов кальция 50–100 мкМ, а кальпаин *B* (*M*-кальпаин) проявляет максимальную активность при концентрации ионов кальция, равной 1–2 мкМ (Shackelford et al., 1994).

Активность кальпаина *B* больше, чем активность кальпаина *A*, и при соответствующей концентрации кальция они оба являются гетеродимерами (Shackelford et al., 1994). Большинство исследователей уверены, что проблема нежной текстуры мяса может быть решена с помощью генетических методов, и кальпаин в этой связи играет наиболее важную роль (Ma et al., 1994; Koohmaraie et al., 1995). Поэтому наилучший способ предсказания нежности мяса должен быть основан на обнаружении индикаторов, способных количественно оценивать систему кальпаина. Более поздние исследования подтвердили тот факт, что кальпаиновая протеаза, действующая посредством декомпозиции белков титина и тубулина, — один из главных факторов в улучшении качества мяса и его нежной текстуры. Результаты исследований по секвенированию *II* регуляторной субъединицы гена кальпаина свидетельствовали о важности полиморфизма этого участка генома.

Проводятся и другие исследования, для того чтобы выявить влияние этого полиморфизма на качество мяса после забоя и особенности роста. В экспериментах на крупном рогатом скоте (Chung et al., 1999) амплифицирован участок гена кальпаина *III* из генома овцы и изучены точечные мутации в этой области при использовании *PCR-SSCP* метода. Установлена значимая разница между жировой прослойкой вокруг бедер, почек и сердца у животных с изучаемыми генотипами (Chung et al., 2001). Н.М. Zhang с коллегами (1996) сообщают об обнаружении ими при помощи *PCR-RFLP* и *HhaI* рестриктазы аллельного полиморфизма регуляторной субъединицы кальпаина *KPC*. В этом исследовании было выявлено три генотипа: *AA*, *AB* и *BB*.

Кальпаастатин

Показано (Sorimachi et al., 1989), что фермент кальпаастатин входит в состав кальпаинового семейства ферментов, но играет отличную от других ферментов роль, а также выступает в качестве специфического ингибитора кальций-зависимых протеаз. В последнее время в его функции стали включать рост, истощение и снижение массы, происходящие после забоя. Таким образом, выраженность структуры и нежности мяса находится под влиянием

функций фермента кальпастатина (Sorimachi et al., 1989), по гену которого обнаружен полиморфизм, а разные аллели влияют на функционирование этой ферментативной системы. В последние годы в связи с вопросом улучшения качества мяса было много сообщений о связи уровня кальпастатина в мышцах и нежности текстуры мяса (Tait et al., 2014a, b). Выявлены генотипы овец, обладатели которых быстрее набирали массу. В.R. Palmer с коллегами (1999) также сообщали о том, что овцы с генотипом *АС* набирали 123 г/день, что на 18 % больше, чем у овец гибридных пород Dorset и Соорвортх, имеющих генотип *АА*.

Таким образом, полиморфизм овец по гену кальпастатина может применяться в качестве маркера производительности по набору веса и качества мяса. Результаты подобных исследований показали, что животные со сниженной активностью кальпастатина дают мясо повышенной мягкости (Whipple et al., 1990; Shackelford et al., 1991a, b; Koohmaraie et al., 1995; Palmer et al., 1998). Ген кальпастатина локализован на пятой хромосоме овец, и его размер составляет около 100 тыс. п. о. Он включает в себя четыре экзона, в экзоне I было обнаружено два аллельных варианта (Palmer et al., 1998). Ген кальпастатина отвечает за ферментную систему, и любые изменения в этой системе приводят к различным заболеваниям (Ma et al., 1994). Кальпаин - кальпастатиновая система оказывает влияние на различные процессы, например, в скелетной мускулатуре она играет значительную роль в регуляции катаболизма и анаболизма белков, развитии и распаде мускулатуры, органогенезе, клеточном цикле, возникновении катаракты, движении мышечных волокон и смерти клеток. Исследования показывают, что механизмы инактивации кальпастатина после забоя животного имеют большую значимость.

Впервые полиморфизм этого гена у овец был изучен (Palmer et al., 1998) с применением метода *PCR-RFLP*, позволившего измерить частоту встречаемости М и N аллелей у овец породы Dorset Horn. Она составила 0,77 и 0,23 соответственно. Результаты исследования пород овец Dorset Down и Соорвортх по определению зависимости между нежностью мяса и генетическим разнообразием кальпастатина показывают, что кальпастатин ускоряет рост и улучшает качество мяса (Palmer et al., 1999).

В другом исследовании (Suleman, 2012) изучена распространенность разных аллельных вариантов этого гена у различных пород. Показано, что аллель С гена кальпастатина значительно как ускоряет рост ягнят, так и увеличивает прибавление ими мышечной массы. Изучение полиморфизма экзона I гена кальпастатина овец породы Kurdish с применением *PCR-SSCP* позволило выявить генотипы *aa*, *ab* и *ac*, встречающиеся с частотой 0,55, 0,32 и 0,13 соответственно.

Средний прирост массы в день для генотипа *ab* (215,22 г) оказался достоверно больше ($p < 0,05$), чем для генотипов *aa* (204,88 г) и *ac* (172,62 г) (Nassiry et al., 2006).

Полиморфизм экзона I гена кальпастатина при изучении его у овец породы Karakul с помощью *PCR-RFLP* и рестрикции ферментом *MspI* выявил частоту встречаемости аллелей М и N 0,79 и 0,21 соответственно, гетерозиготность овец породы Karakul в среднем составляет 33 % (Eftekhar Shahroudi et al., 2006).

В исследованиях на крупном рогатом скоте сравнивались по гену кальпастатина геномы пород Taurus и Bos Indicus. Результаты исследований показали, что различия в активности гена кальпастатина – главный фактор, приводящий к отличию в нежности мяса. Мясо породы Bos Taurus нежнее, чем породы Bos Indicus (Koohmaraie, 1992).

Мясистость является основным показателем продуктивности для мясных пород овец, в то же время это комплексный признак, на формирование которого оказывают влияние как генетические, так и природно-климатические факторы и условия содержания. Генетика и молекулярная биология представляют в настоящее время доступный инструмент для проведения целенаправленной, а значит высокоэффективной селекции сельскохозяйственных животных. Простейшие ДНК-маркеры могут позволить отобрать животных российской селекции для формирования перспективного ядра. Многообещающие генетические маркеры мясистой – аллельные варианты генов гормона роста, кальпаина и кальпастатина и SNP-каллипингии. Безусловно, для развертывания в России селекции на их основе необходимо исследовать встречаемость вариантов этих генов среди отечественных пород овец и активнее использовать методы молекулярной биологии в овцеводстве.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Anthony R.V., Liang R., Kayl E.P., Pratt S.L. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. J. Reprod. Fert. Suppl. 1995;49:83-95.
- Bi P., Kuang S. Meat science and muscle biology symposium: Stem cell niche and postnatal muscle growth. J. Anim. Sci. 2012;90(3): 924-935.
- Boman I.A., Klemetsdal G., Nafstad O., Blichfeldt T., Våge D.I. Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (Ovis aries). Genet. Sel. Evol. 2010;42:4.
- Busboom J.R., Wahl T.I., Snowden G.D. Economics of callipyge lamb production. J. Anim. Sci. 1999;77(Suppl. 2):243-248.
- Byrne K., Vuocolo T., Gondro C., White J.D., Cockett N.E., Hadfield T., Bidwell C.A., Waddell J.N., Tellam R.L. A gene network switch enhances the oxidative capacity of ovine skeletal muscle during late fetal development. BMC Genomics. 2010;11(1):378.
- Caiment F., Charlier C., Hadfield T., Cockett N., Georges M., Baurain D. Assessing the effect of the CLPG mutation on the microRNA catalog of skeletal muscle using high-throughput sequencing. Genome Res. 2010;20(12):1651-1662.
- Carpenter C.E., Cockett N.E. Histology of longissimus muscle from 2-week-old and 8-week-old normal and callipyge lambs. Can. J. Anim. Sci. 2000;80(3):511-514.
- Carpenter C.E., Rice O.D., Cockett N.E., Snowden G.D. Histology and composition of muscles from normal and callipyge lambs. J. Anim. Sci. 1996;74(2):388-393.
- Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldaña H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics. 1989;4(4):479-497.
- Chung H.Y., Davis M.E., Hines H.C. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. Anim. Genet. 1999;30(1):80.
- Chung H.Y., Davis M.E., Hines H.C. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. Anim. Genet. 2001;32(1):53.
- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.-M., Eychenne F., Larzul C., Laville E.,

- Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* 2006;38(7): 813-818.
- Cockett N.E., Smit M.A., Bidwell C.A., Segers K., Hadfield T.L., Snowden G.D., Georges M., Charlier C. The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 2005;37(Suppl. 1):S65-S81.
- Eftekhari Shahrudi F.E., Nassiry M.R., Valizad R., Moussavi A.H., Tahmoorespour M., Ghiasi H. Genetic polymorphism at MTR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iran J. Biotechnol.* 2006;4:117-122.
- Everts A.K.R., Wulf D.M., Wheeler T.L., Everts A.J., Weaver A.D., Daniel J.A. Enhancement technology improves palatability of normal and callipyge lambs. *J. Anim. Sci.* 2010;88(12):4026-4036.
- Freking B.A., Murphy S.K., Wylie A.A., Rhodes S.J., Keele J.W., Leymaster K.A., Jirtle R.L., Smith T.P.L. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Res.* 2002;12(10):1496-1506.
- Gardner G.E., Williams A., Siddell J., Ball A.J., Mortimer S., Jacob R.H., Pearce K.L., Hocking Edwards J.E., Rowe J.B., Pethick D.W. Using Australian sheep breeding values to increase lean meat yield percentage. *Anim. Prod. Sci.* 2010;50(12):1098.
- Goddard M.E., Hayes B.J. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet. Z. Für. Tierz. Zücht.* 2007;124(6):323-330.
- Gootwine E., Rozov A. Seasonal effects on birth weight of lambs born to prolific ewes maintained under intensive management. *Livest. Sci.* 2006;105(1-3):277-283.
- Gootwine E., Sise J.A., Penty J.M., Montgomery G.W. The duplicated gene copy of the ovine growth hormone gene contains a PvuII polymorphism in the second intron. *Anim. Genet.* 1993;24(4):319-321.
- Greenwood P.L., Davis J.J., Gaunt G.M., Ferrier G.R. Influences on the loin and cellular characteristics of the m. longissimus lumborum of Australian Poll Dorset-sired lambs. *Aust. J. Agric. Res.* 2006; 57(1):1.
- Hopkins D.L., Toohey E.S., Lamb T.A., Kerr M.J., Ven R. van de, Refshauge G. Explaining the variation in the shear force of lamb meat using sarcomere length, the rate of rigor onset and pH. *Meat Sci.* 2011;88(4):794-796.
- Jackson S.P., Green R.D., Miller M.F. Phenotypic characterization of rambouillet sheep expressing the callipyge gene: I. Inheritance of the condition and production characteristics. *J. Anim. Sci.* 1997a; 75(1):14-18.
- Jackson S.P., Miller M.F., Green R.D. Phenotypic characterization of Rambouillet sheep expressing the callipyge gene: II. Carcass characteristics and retail yield. *J. Anim. Sci.* 1997b;75(1):125-132.
- Jackson S.P., Miller M.F., Green R.D. Phenotypic characterization of rambouillet sheep expression the callipyge gene: III. Muscle weights and muscle weight distribution. *J. Anim. Sci.* 1997c;75(1): 133-138.
- Johnson P.L., Dodds K.G., Bain W.E., Greer G.J., McLean N.J., McLaren R.J., Galloway S.M., Stijn T.C. van, McEwan J.C. Investigations into the GDF8 g+6723G-A polymorphism in New Zealand Texel sheep. *J. Anim. Sci.* 2009;87(6):1856-1864.
- Kidwell M.G., Kidwell J.F., Sved J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics.* 1977;86(4):813-833.
- Koohmaraie M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie.* 1992; 74(3):239-245.
- Koohmaraie M., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Lonergan S.M., Doumit M.E. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J. Anim. Sci.* 1995;73(12):3596-3607.
- Kossiakoff A.A. The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors. *Adv. Protein Chem.* 2004;68:147-169.
- Lacroix M.C., Devinoy E., Cassy S., Servely J.L., Vidaud M., Kann G. Expression of growth hormone and its receptor in the placental and feto-maternal environment during early pregnancy in sheep. *Endocrinology.* 1999;140(12):5587-5597.
- Lacroix M.C., Devinoy E., Servely J.L., Puissant C., Kann G. Expression of the growth hormone gene in ovine placenta: detection and cellular localization of the protein. *Endocrinology.* 1996;137(11): 4886-4892.
- Lacroix M.C., Guibourdenche J., Fournier T., Laurendeau I., Igout A., Goffin V., Pantel J., Tsatsaris V., Evain-Brion D. Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology.* 2005;146(5):2434-2444.
- Lacroix M.C., Guibourdenche J., Frendo J.L., Muller F., Evain-Brion D. Human placental growth hormone-a review. *Placenta.* 2002;23 (Suppl. A):S87-S94.
- Lambe N.R., Richardson R.I., Macfarlane J.M., Nevison I., Haresign W., Matika O., Bünger L. Genotypic effects of the Texel Muscling QTL (TM-QTL) on meat quality in purebred Texel lambs. *Meat Sci.* 2011;89(2):125-132.
- Liu G.-Q., Dai R., Ren H.-X., Wang X.-H., Liu S.-R., Sun Y.-L., Yang L.-G. [Polymorphism analysis of genes associated with hind-quarters muscular development on chromosome 18 in Xinjiang meat sheep]. *Yi Chuan Hered. Zhongguo Yi Chuan Xue Hui Bian Ji.* 2006;28(7):815-820.
- Ma H., Yang H.Q., Takano E., Hatanaka M., Maki M. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biol. Chem.* 1994;269(39): 24430-24436.
- Macfarlane J.M., Lambe N.R., Matika O., Johnson P.L., Wolf B.T., Haresign W., Bishop S.C., Bünger L. Effect and mode of action of the Texel muscling QTL (TM-QTL) on carcass traits in purebred Texel lambs. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 2014;1-9.
- MacIntosh B.R., Gardiner P.F., McComas A.J. Skeletal muscle: form and function. Champaign, IL: Human Kinetics, 2006.
- Masri A.Y., Lambe N.R., Macfarlane J.M., Brotherstone S., Haresign W., Bünger L. Evaluating the effects of a single copy of a mutation in the myostatin gene (c.*1232G > A) on carcass traits in crossbred lambs. *Meat Sci.* 2011a;87(4):412-418.
- Masri A.Y., Lambe N.R., Macfarlane J.M., Brotherstone S., Haresign W., Bünger L. Evaluating the effects of the c.*1232G > A mutation and TM-QTL in Texel x Welsh Mountain lambs using ultrasound and video image analyses. *Small Rumin. Res.* 2011b;99(2-3): 99-109.
- Masri A.Y., Lambe N.R., Macfarlane J.M., Brotherstone S., Haresign W., Rius-Vilarrasa E., Bünger L. The effects of a loin muscling quantitative trait locus (LoinMAXTM) on carcass and VIA-based traits in crossbred lambs. *Animal.* 2010;4(03):407.
- Matika O., Sechi S., Pong-Wong R., Houston R.D., Clop A., Williams J.A., Bishop S.C. Characterization of OAR1 and OAR18 QTL associated with muscle depth in British commercial terminal sire sheep: Characterization of sheep muscle depth QTL. *Anim. Genet.* 2011;42(2):172-180.
- McRae A.F., Bishop S.C., Walling G.A., Wilson A.D., Visscher P.M. Mapping of multiple quantitative trait loci for growth and carcass traits in a complex commercial sheep pedigree. *Anim. Sci.* 2005; 80(02):135-141.
- Moore R.K., Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2005;234(1-2): 67-73.
- Murphy V.E., Smith R., Giles W.B., Clifton V.L. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr. Rev.* 2006;27(2):141-169.
- Nassiry M.R., Tahmoorespour M., Javadmanesh A., Soltani M., Foroutani F.S. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. *Iran J. Biotechnol.* 2006;4:188-192.
- Nicol L., Bishop S.C., Pong-Wong R., Bendixen C., Holm L.-E., Rhind S.M., McNeilly A.S. Homozygosity for a single base-pair

- mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*. 2009;138(6):921-933.
- Ofir R., Gootwine E. Ovine growth hormone gene duplication – structural and evolutionary implications. *Mamm. Genome*. 1997;8(10):770-772.
- Palmer B.R., Morton J.D., Roberts N., Ilian M.A., Bickerstaffe R. Marker-assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 1999;59:266-268.
- Palmer B.R., Roberts N., Hickford J.G., Bickerstaffe R. Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.* 1998;76(5):1499-1500.
- Phua S.H., Brauning R., Baird H.J., Dodds K. Identifying chromosomal selection-sweep regions in facial eczema selection-line animals using an ovine 50K-SNP array. *Anim. Genet.* 2014;45(2):240-247.
- Piper L.R., Bell A.M., Ward K.A., Brown B.W. Effect of ovine growth hormone transgenesis on performance of Merino sheep at pasture. 1. Growth and wool traits to 12 months of age. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Gen.* 2001;14:257-260.
- Ray J., Okamura H., Kelly P.A., Cooke N.E., Liebhaber S.A. Human growth hormone-variant demonstrates a receptor binding profile distinct from that of normal pituitary growth hormone. *J. Biol. Chem.* 1990;265(14):7939-7944.
- Reicher S., Niv-Spector L., Gertler A., Gootwine E. Pituitary and placental ovine growth hormone variants differ in their receptor-binding ability and in their biological properties. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008;155(2):368-377.
- Reicher S., Seroussi E., Gootwine E. A mutation in gene CNGA3 is associated with day blindness in sheep. *Genomics*. 2010;95(2):101-104.
- Rius-Vilarrasa E., Roehe R., Macfarlane J., Lambe N., Matthews K., Haresign W., Matika O., Bünge L. Effects of a quantitative trait locus for increased muscularity on carcass traits measured by subjective conformation and fat class scores and video image analysis in crossbred lambs. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 2009;3(11):1532-1543.
- Sazili A., Lee G., Parr T., Sensky P., Bardsley R., Buttery P. The effect of altered growth rates on the calpain proteolytic system and meat tenderness in cattle. *Meat Sci.* 2004;66(1):195-201.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Cundiff L.V., Gregory K.E., Rohrer G.A., Savell J.W. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 1994;72(4):857-863.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Miller M.F., Crouse J.D., Reagan J.O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* 1991a;69(1):171-177.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Whipple G., Wheeler T.L., Miller M.F., Crouse J.D., Reagan J.O. Predictors of beef tenderness: development and verification. *J. Food Sci.* 1991b;56(5):1130-1135.
- Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. Effect of the callipyge phenotype and cooking method on tenderness of several major lamb muscles. *J. Anim. Sci.* 1997;75(8):2100-2105.
- Smit M., Segers K., Carrascosa L.G., Shay T., Baraldi F., Gyapay G., Snowden G., Georges M., Cockett N., Charlier C. Mosaicism of Solid Gold supports the causality of a noncoding A-to-G transition in the determinism of the callipyge phenotype. *Genetics*. 2003;163(1):453-456.
- Soares M.J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004;2:51.
- Solomon G., Reicher S., Gussakovsky E.E., Jomain J.-B., Gertler A. Large-scale preparation and in vitro characterization of biologically active human placental (20 and 22K) and pituitary (20K) growth hormones: placental growth hormones have no lactogenic activity in humans. *Growth Horm. IGF Res.* 2006;16(5-6):297-307. Epub 2006 Sep 28.
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y., Kawasaki H., Ohno S., Minami Y., Suzuki K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1989;264(33):20106-20111.
- Suleman M. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds. *Afr. J. Biotechnol.* 2012;4(47):10655-10660.
- Sun W., Hudson N.J., Reverter A., Waardenberg A.J., Tellam R.L., Vuocolo T., Byrne K., Dalrymple B.P. An always correlated gene expression landscape for ovine skeletal muscle, lessons learnt from comparison with an “equivalent” bovine landscape. *BMC Res. Notes*. 2012;5(1):632.
- Tait R.G., Shackelford S.D., Wheeler T.L., King D.A., Casas E., Thallman R.M., Smith T.P.L., Bennett G.L. μ -Calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies. *J. Anim. Sci.* 2014a;92(2):456-466.
- Tait R.G., Shackelford S.D., Wheeler T.L., King D.A., Keele J.W., Casas E., Smith T.P.L., Bennett G.L. CAPN1, CAST, and DGAT1 genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in a beef cattle population selected for haplotype and allele equalization. *J. Anim. Sci.* 2014b;92(12):5382-5393.
- Tellam R.L., Cockett N.E., Vuocolo T., Bidwell C.A. Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. *Front. Genet.* 2012;3:164.
- The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik C.G., Tellam R.L., Worley K.C., Gibbs R.A., Muzny D.M., Weinstein G.M., Adelson D.L., Eichler E.E., Eltnitski L., Guigó R., ... , White S.N., Wilming L.G., Wunderlich K.R., Yang J., Zhao F.Q. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*. 2009;324(5926):522-528.
- The International Sheep Genomics Consortium, Archibald A.L., Cockett N.E., Dalrymple B.P., Faraut T., Kijas J.W., Maddox J.F., McEwan J.C., Hutton Oddy V., Raadsma H.W., Wade C., Wang J., Wang W., Xun X. The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Anim. Genet.* 2010;41:449-453.
- Tomita T. One-side cross sterility between inbred strains of mice. *Jpn. J. Genet.* 1960;35:291.
- Valinsky A., Shani M., Gootwine E. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Anim. Biotechnol.* 1990;1(2):135-144.
- Walling G.A., Visscher P.M., Wilson A.D., McTeir B.L., Simm G., Bishop S.C. Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *J. Anim. Sci.* 2004;82(8):2234-2245.
- Wallis M., Lioupis A., Wallis O.C. Duplicate growth hormone genes in sheep and goat. *J. Mol. Endocrinol.* 1998;21(1):1-5.
- Walsh S.T.R., Sylvester J.E., Kossiakoff A.A. The high- and low-affinity receptor binding sites of growth hormone are allosterically coupled. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004;101(49):17078-17083.
- Warner R.D., Greenwood P.L., Pethick D.W., Ferguson D.M. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Sci.* 2010;86(1):171-183.
- Whipple G., Koohmaraie M., Dikeman M.E., Crouse J.D., Hunt M.C., Klemm R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. *J. Anim. Sci.* 1990;68(9):2716-2728.
- Zhang H.M., DeNise S.K., Ax R.L. Rapid communication: a novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. *J. Anim. Sci.* 1996;74(6):1441.
- Zhang L., Liu J., Zhao F., Ren H., Xu L., Lu J., Zhang S., Zhang X., Wei C., Lu G., Zheng Y., Du L. Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e66569.

Полиморфизм локусов масти у мини-свиней

С.В. Никитин¹, К.С. Шатохин², С.П. Князев³, Г.М. Гончаренко², В.И. Запорожец¹, В.И. Ермолаев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии Российской академии наук», пос. Краснообск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия

Настоящая работа имеет феноменологический, чисто описательный характер. В ней рассмотрен полиморфизм окрасок мини-свиней селекционной группы Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ) и высказаны некоторые предположения о генетической природе этого разнообразия. В стаде мини-свиней ИЦиГ присутствуют окраска дикого типа (агути), черно-пестрая, черная и белая масти. Все перечисленные масти имеют варианты, в том числе ранее в литературе не описанные, различия между которыми являются генетически обусловленными. Кроме этого, у мини-свиней ИЦиГ присутствуют варианты масти, присущие только гетерозиготным особям, а также описанная только у примитивных домашних свиней архаичная серая масть. Сопоставление наблюдаемых в селекционной группе фенотипов масти с литературными данными показало, что полиморфны локусы *EDNRB*, *KIT*, *KITLG* и *MC1R*, а мономорфны – *ASIP*, *OCA2* и *TYRP1*. Таким образом, локусы, которые контролируют наиболее распространенные масти домашних свиней, полиморфны, а локусы, контролирующие редкие или относительно редкие масти, мономорфны. Исследование позволило выдвинуть некоторые предположения, касающиеся особенностей генетической детерминации фенотипов масти, наблюдаемых в изучаемой селекционной группе. В том числе это предположения о генетическом контроле ювенильных окрасок домашних свиней. Наблюдения, проведенные в стаде мини-свиней селекции ИЦиГ, позволили изучить и описать особенности возрастного изменения одного из вариантов черно-пестрой масти, когда первоначально черно-пестрые по кирпичному фону новорожденные поросята в возрасте одного года имеют серый чалый фон, формируемый смесью белых и черных волос. Кроме того, было показано, что с помощью технических средств черно-пестрость может быть обнаружена и на черном фоне.

Ключевые слова: масть домашних свиней; фенотипы окраски; *KIT*; *MC1R*; мини-свиньи ИЦиГ.

Polymorphic loci of coat color in mini-pigs

S.V. Nikitin¹, K.S. Shatokhin², S.P. Knyazev³, G.M. Goncharenko², V.I. Zaporozhets¹, V.I. Ermolayev¹

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

² Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

The present work is phenomenological and purely descriptive. It shows polymorphism of colors in a breeding group of mini-pig in the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS) and makes some assumptions about the nature of this genetic diversity. In the ICG SB RAS mini-pig herd, wild-type coloration (agouti), black-spots, black and white color are present. All these options have variants, including previously undescribed, with genetically determined differences. In addition, the ICG SB RAS mini-pigs have variants inherent only to heterozygous individuals and archaic gray color described only in primitive domestic pig. Comparison of the observed color phenotypes in the breeding with literature data showed that *EDNRB*, *KIT*, *KITLG* and the *MC1R* are polymorphic loci, while *ASIP*, *OCA2* and *TYRP1* are monomorphic loci. Thus, the loci that control the most common coat colors in domestic pigs are polymorphic, while those controlling rare or relatively rare colors and monomorphic. The research allowed us to put forward some assumptions concerning the genetic determination of the phenotypic characteristics of color seen in the study group selection. Among these assumptions is one about the genetic control of juvenile colors in domestic pigs. Observations made in the ICG SB RAS mini-pig breeding group allowed us to examine and describe the features of age-related changes of an embodiment of black-motley suit, when newborn piglets originally have black-and-motley fur color on the brick-red background and at an age of one year, a gray roan background formed by a mixture of white and black hairs. In addition, it was shown that with the help of technical means black spots can also be detected on a black background.

Key words: coat color of domestic pigs; color phenotypes; *KIT*; *MC1R*; ICG SB RAS mini-pigs.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Никитин С.В., Шатохин К.С., Князев С.П., Гончаренко Г.М., Запорожец В.И., Ермолаев В.И. Полиморфизм локусов масти у мини-свиней. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):584-595. DOI 10.18699/VJ16.180

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nikitin S.V., Shatokhin K.S., Knyazev S.P., Goncharenko G.M., Zaporozhets V.I., Ermolayev V.I. Polymorphic loci of coat color in mini-pigs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):584-595. DOI 10.18699/VJ16.180

REVIEW

Received 16.08.2016

Accepted for publication 22.09.2016

© AUTHORS, 2016

Изучение генетики окрасок домашних свиней началось в первые десятилетия XX в. (Волкопялов и др., 1934; Buchaman-Smith et al., 1935). К концу столетия были установлены особенности генетического контроля основных окрасок свиней, а в употребление введены принятые в этот период для всех видов млекопитающих названия и обозначения соответствующих генов и аллелей (Searle, 1968; Ollivier, Sellier, 1982; Legault, 1998). В целом на протяжении XX в. у свиней гибридологическим методом было выявлено и описано восемь основных, контролируемых масть генов (табл. 1).

Позднее, с появлением молекулярно-генетических методов, в представления о генетическом контроле масти свиней были внесены корректировки, а прежнюю номенклатуру обозначений заменила более современная. Было показано, что синтез и ингибирование пигментов контролируются девятью локусами, в основном совпадающими с прежними генами (табл. 2). Расхождение обнаружено для черно-пестрой масти, которую, согласно современным данным, могут контролировать два локуса *MC1R* и *EDNRB* (Andersson, Plastow, 2011; Wilkinson et al., 2013), а не один, как считалось раньше (Kosswig, Ossent, 1931; Ollivier, Sellier, 1982; Legault, 1998; Kijas et al., 2001). Второе расхождение касается окрасок, обозначенных как «серые пятна» и «зернистость», за которые, согласно последним данным, отвечают аллели локуса *KIT* (Hirooka et al., 2002; Fontanesi, Russo, 2013), тогда как ранее гибридологическим методом было показано, что эти окраски являются совместным продуктом двух тесно сцепленных генов *Inhibitor of color* и *Spotted* (Никитин, Ворожейкин, 1994; Никитин, Лобков, 1996). Третье расхождение касается так называемого «белого пояса», который, как полагали ранее (Ollivier, Sellier, 1982), детерминировал доминантный аллель гена *White Belt*. В настоящее время считают, что за «белый пояс» и некоторые другие варианты пегостей отвечают аллели локуса *KIT*, ограничивающие экспрессию пигментирующих генов на отдельных участках тела (Giuffra et al., 1999; Fontanesi et al., 2010; Fontanesi, Russo, 2013).

В целом современные молекулярно-генетические методы подтвердили, что ведущую роль в формировании окраски свиней играют локусы *MC1R* (*Extension*) и *KIT* (*Inhibitor of color*). Локус *MC1R* контролирует синтез меланокортина, различные варианты которого обеспечивают проявление красной, желтой и черной масти (Kijas et al., 1998; Carrion et al., 2003; Lai et al., 2007; Fang et al., 2009). Локус *KIT*, напротив, контролирует синтез белков-ингибиторов меланина, что приводит к полной или частичной депигментации животных (Giuffra et al., 1999; Pielberg et al., 2002; Fontanesi et al., 2010, 2012; Fontanesi, Russo, 2013).

Цель настоящего исследования заключается в описании фено- и генотипического разнообразия окрасок мини-свиней ИЦиГ и включает следующие конкретные задачи:

- анализ данных литературы о фенотипах и генотипах окраски домашних свиней;
- собственно описание вариантов окрасок (фенотипов) мини-свиней ИЦиГ;
- сопоставление этих вариантов с фено- и генотипами, описанными в литературе;

- определение вероятного списка генотипов и аллелей локусов окраски, присутствующих у мини-свиней ИЦиГ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили лабораторные мини-свиньи, разводимые в питомнике Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, расположенном в пос. Каинская Займка Новосибирского района Новосибирской области. Родоначальниками этой селекционной группы были крупная белая, ландраская, вьетнамская вислобрюхая пастбищная породы и светлогорские мини-свиньи (Шатохин и др., 2014). Мини-свиньи ИЦиГ отличаются высоким разнообразием окрасок (Никитин и др., 2014). Фенотипы окраски определяли визуально, вероятные генотипы – на основании литературных источников (см. табл. 1 и 2).

Результаты

Дикий тип (агути). Кожа черная, щетина буро-серая с зонарным распределением пигментов. На разных частях тела интенсивность цвета щетины различна. У диких кабанов, в зависимости от подвида, цвет щетины варьирует от буро-серого до черно-серого (Данилкин, 2002). Типичный волос агути имеет терминальную или субтерминальную желто-оранжевую полосу и черное или коричневое основание и среднюю часть (Всеволодов и др., 1992). Окраске дикого типа свойственна ювенильная ливрея – продольные темные полосы на светлом (буром или рыжем) фоне. Их обычное расположение – одна полоса проходит по хребту и три на каждом боку (Козло, 1973; Данилкин, 2002). Масть агути является исходной, она свойственна дикому кабану и встречается у некоторых примитивных аборигенных пород и одичавших свиней (Lauvergne et al., 1982; Mayer, Brisbin, 1993; McCann et al., 2003; Тихонов, 2010; Иванчук, 2011). Первоначально считали, что масть агути контролирует ген *Agouti* (см. табл. 1), регулирующий распределение черного и красного пигмента вдоль волоса и между верхней и нижней частями туловища. Предполагалось, что доминантные аллели гена *Agouti* A^b и A^w детерминируют отдельные варианты агути (Lauvergne et al., 1982), а рецессивные аллели a^s и a – соответственно осветление, сеเปีย (Berge, 1961), и отсутствие окраски агути (Lush, 1921; Ossent, 1929; Kosswig, Ossent, 1931; Constantinescu, 1933; Teodoreanu, 1935). В настоящее время показано, что масть агути является результатом взаимодействия аллелей локусов *ASIP* и *MC1R* (Drögemüller et al., 2006; Lightner, 2009; Mao et al., 2010). Особи с генотипами $A/\dots$ и E^+/E^+ , E^+/E^P или E^+/e имеют масть агути, с генотипами a/a и E^+/E^+ , E^+/E^P или E^+/e – рецессивную черную.

Среди мини-свиней ИЦиГ особи рецессивной черной масти не выявлены, поэтому есть основания полагать, что по локусу *ASIP* они имеют генотип A/A . Масть агути у мини-свиней ИЦиГ представлена целой палитрой вариантов (рис. 1), в которой можно выделить две последовательности. В первой цвет животных изменяется от бурого до светло-серого, во второй – от бурого до почти черного. Возможно, это указывает, что действуют две группы генов, одна из которых уменьшает в шерсти мини-свиней концентрацию красного, а вторая – увеличивает концентрацию

Table 1. Alleles and genes for pig colors detected by test crosses

Gene		Allele	Phenotype for coat color	References
Agouti	A	A	Agouti	Ollivier, Sellier, 1982
		A ^b	Agouti with badger face	
		A ^w	Agouti with white belly	
		a	Non-agouti	
		a ^s	Sepia	
Brown	B	B	Normal (no brown)	
		b	Brown	
Albinism	C	C	Normal pigmentation	
		c ^e	Albino	
Dilution	D	D	Normal	
		d ^s	Sepia (diluted color)	
Extension	E	E ^D	Dominant Black	
		E	Normal (Agouti or Recessive Black)	
		E ^P	Black and White	
		e	Red	
		e ^h	White face	
Inhibitor of color, Dominant White	I	I	Epistatic White	
		I ^d	Roan	
		i	Colored (non White)	
		i ^m	Dingy White	
White Belt	Be	Be	White Belt	
		be	Completely colored	
		be ^h	White forepart	
Spotted	Sp	Sp	Clean White	Nikitin, Vorozheikin, 1994
		sp	Gray Spots	
		sp ^{let}	Early pregnant mortality	Nikitin, Lobkov, 1996

Table 2. Loci and alleles controlling pig color that were revealed by methods of molecular genetics

Locus	Gene	Allele	Phenotype	References
ASIP	A	A	Agouti	Drögemüller et al., 2006; Mao et al., 2010; Andersson, Plastow, 2011
EDNRB	–	–	Black and White	Andersson, Plastow, 2011; Wilkinson et al., 2013
KIT	I	I ¹ , I ² , I ³	White	Pielberg et al., 2002; Andersson, Plastow, 2011
		I ^{Rn} /I ^d	Grey Roan	Andersson, Plastow, 2011; Fontanesi et al., 2012
		i ^m	Dingy White	Andersson, Plastow, 2011; Fontanesi, Russo, 2013
		–	White Legs	
	I+Sp	I ^P	Gray Spots	Hirooka et al., 2002
		–	Grain	
	Be	I ^{Be}	White Belt	Giuffra et al., 1999; Fontanesi et al., 2010; Andersson, Plastow, 2011
KITLG	A	–	White face	
		–	White belly	
		–	White face	
MC1R	E	E ^{D1} , E ^{D2}	Black	Kijas et al., 1998; Fang et al., 2009
		e	Red	
		E ⁺	Agouti	
		E ^P	Black and white, spots	Kijas et al., 2001
MYO5A	D	–	Dilution of pigmentation	Andersson, Plastow, 2011
OCA2	P	–	Depigmentation	Fernandez et al., 2006
TYR	C	–	Albino	Andersson, Plastow, 2011
TYRP1	B	–	Brown	Andersson, Plastow, 2011; Ren et al., 2011

черного пигмента. Следует подчеркнуть, что все особи масти агути, отбирившиеся в воспроизводящий состав селекционной группы на протяжении трех лет (2012–2015), оказались по локусу *MC1R* гетерозиготами E/E^p .

Черно-пестрая. Черные пятна на белом и красном фоне. Эту масть имеют польско-китайские, кемеровские, миргородские и некоторые другие европейские и азиатские породы (Кабанов, Терентьева, 1985). Физиологический механизм черно-пестрости основан на неравномерности распределения меланокортина по поверхности тела и его концентрации в виде черных пятен (Fang et al., 2009). Детерминирует черно-пеструю масть аллель E^p гена *Extension* (Ollivier, Sellier, 1982) или, в современной номенклатуре, локуса *MC1R* (Kijas et al., 2001). Данная мутация широко распространена в популяции европейского дикого кабана (Козло, 1973; Meynhardt, 1978). Маловероятно, что аллель E^p возник у этого подвида, но то, что он широко закрепился у дикой формы, несмотря на явно неадаптивную окраску гомозигот, наводит на мысль о преимуществе гетерозигот над гомозиготами дикого типа. Аллель E^p был описан в первой половине XX в. (Carr-Saunders, 1922; Kosswig, Ossent, 1931; Hetzer, 1945a–d). Тогда же был установлен и порядок доминирования $E^+ > E^p$ (Hetzer, 1946). Исходно гипотеза о детерминации черно-пестрой масти содержала два положения (Ollivier, Sellier, 1982):

- 1) черно-пестрые свиньи имеют генотип E^p/E^p независимо от фонового цвета;
- 2) фоновым может быть белый или красный (рыжий) цвет.

В настоящее время относительно фонового цвета черно-пестрой масти существуют две точки зрения. Согласно первой, черная пятнистость на красном или белом фоне может быть результатом действия двух различных мутаций в локусе *MC1R* (Kijas et al., 2001). Согласно второй, черные пятна на белом или красном фоне являются результатом взаимодействия меланокортина и эндотелина, последний из которых подконтролен влиянию полиморфного локуса *EDNRB* (Wilkinson et al., 2013). Разделение собственно черно-пестрости и фонового цвета не ограничивает вариацию последнего двумя цветами и вполне допускает существование описанного у европейских диких кабанов варианта, в котором фоновой является масть агути (Козло, 1973; Meynhardt, 1978).

У мини-свиней ИЦиГ черно-пестрая масть представлена четырьмя вариантами фонового цвета, которые распадаются на две группы:

- 1) фон агути и черный (рис. 1–3). У черно-пестрых животных с черным фоном более темные пятна увидеть при обычном освещении практически невозможно, однако на фотографиях, снятых со вспышкой, они становятся заметны в нижней части туловища, где кожа светлее, а щетина реже;

- 2) фон белый, серый чалый, кирпичный чалый (рис. 4).

При осмотре животных обращает на себя внимание то, что в первой группе число черных пятен существенно меньше и сами пятна по большей части мельче (см. рис. 1–3), чем у особей второй группы (см. рис. 4). Рождение черно-пестрых гомозигот E^p/E^p в скрещиваниях, где родители относились к первой группе вариантов

черно-пестрой масти (фон агути или черный), показывает, что особи подобной расцветки гетерозиготны и, соответственно, имеют генотипы E^+/E^p и E^D/E^p .

У особей черно-пестрой масти с серым и кирпичным чалым фоном (см. рис. 4) черных пятен существенно больше, и они значительно крупнее, чем в первой группе, а ливрея всегда отсутствует. Расщепление в потомстве таких родителей по признаку «черно-пестрая масть» у мини-свиней ИЦиГ отсутствует, все они гомозиготы E^p/E^p .

Таким образом, рассмотрение вариантов черно-пестрой масти у мини-свиней ИЦиГ с гетерозиготными генотипами E^+/E^p и E^D/E^p показывает, что доминирование аллелей E^+ и E^D над аллелем E^p неполное, а черные пятна и цвет основного фона у гетерозигот детерминируются разными аллелями локуса *MC1R*: черные пятна – рецессивным аллелем E^p , а основной фон – доминантными аллелями E^+ или E^D .

Не менее интересны варианты черно-пестрой масти у гомозигот E^p/E^p . Серому и кирпичному цвету основного фона свойственна та или иная степень чалости – смешения белых и пигментированных волос. Белый фон является вариантом с минимальным количеством пигментированных волос. Слабо выраженную чалость, обусловленную незначительной примесью белых волос, имеют и гетерозиготы E^+/E^p с фоном агути (см. рис. 1), что позволяет предположить участие аллеля E^p в ее формировании. У черно-пестрых мини-свиней серый фон представляет смесь волос белого и черного цвета, а кирпичный – белого, черного и красно-бурого. Основной фон у последних с возрастом изменяется вследствие увеличения количества черных и уменьшения красно-бурых волос. Поэтому особи, которые при рождении имели почти чисто-белый основной фон, к возрасту одного года приобретают фон светлого синевато-серого цвета. Такой же фон приобретают и особи, у которых при рождении он был кирпичным.

Черная. В селекционной группе мини-свиней ИЦиГ выявлены два варианта черной масти: доминантная черная и беркширская. Первый из этих вариантов в изучаемой селекционной группе обычен, тогда как второй имеют лишь единичные особи. Черную одноцветную масть имеют свиньи гемпширской, корнуэльской, крупной черной, вьетнамской и некоторых азиатских пород (Волкопялов и др., 1934; Ollivier, Sellier, 1982; Кабанов, Терентьева, 1985; Тихонов, 2010). Гибридологическим методом установлено, что черную масть у свиней детерминирует аллель E^D (доминантная черная) гена *Extension* (Hetzer, 1948; Ollivier, Sellier, 1982), который был открыт при скрещивании дикого кабана с черно-белой опоясанной ганновер-брауншвейгской неулущенной крестьянской свиньей (Волкопялов и др., 1934). Позднее С. Kosswig и Н.Р. Ossent (1931) подтвердили существование данного аллеля. В настоящее время показано, что существуют два аллеля E^{D1} и E^{D2} локуса *MC1R* с тождественным фенотипическим эффектом (Kijas et al., 1998; Fang et al., 2009). Черная масть гипостатична по отношению к эпистатической белой и наличию белых участков на теле (Ollivier, Sellier, 1982; Giuffra et al., 1999; Fontanesi et al., 2010; Fontanesi, Russo, 2013; Wilkinson et al., 2013). Следует заметить, что среди

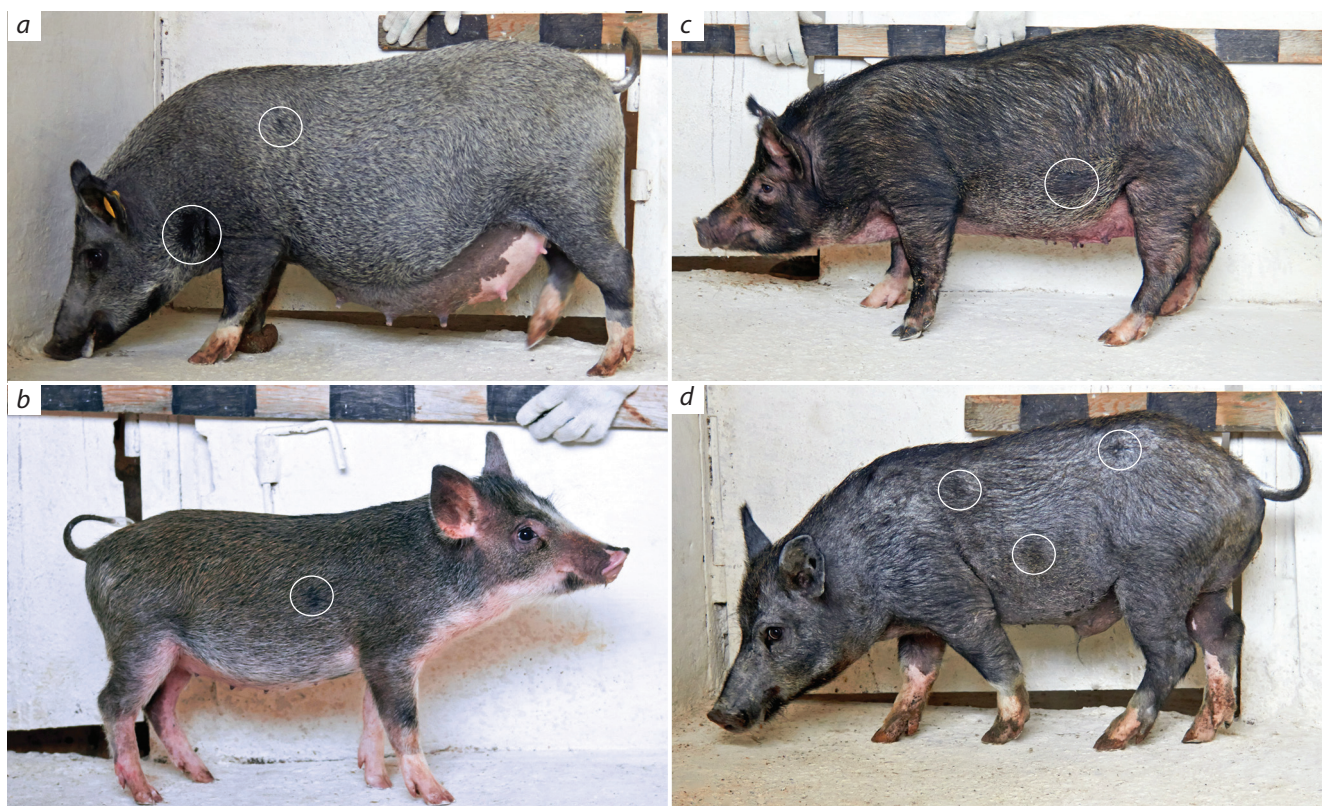


Fig. 1. Mini-pigs of ICG with Agouti color and genotype A/A E^+/E^P .

Colors: a, gray; b, muddy brown; c, brown; d, dark. Dark spots are encircled. Photo by V. Koval.

воспроизводящего состава мини-свиней ИЦиГ особи черной масти, подобно особям с мастью агутти, являются гетерозиготами E^D/E^P (см. рис. 2).

Так называемая беркширская масть представляет шесть белых отметин (на лбу, ногах над копытами и кончике хвоста) на основном черном фоне. Кожа беркширов темная, но после термической обработки обесцвечивается



Fig. 2. A black-and-white-spotted pig with genotype E^D/E^P .

Dark spots are encircled. Photo by V. Koval.

(Харинг, 1965). Долгое время беркширскую масть считали разновидностью черно-пестрой окраски с красным фоном. Собственно говоря, для этого были очень веские основания. В скрещиваниях чисто-красных свиней (генотип e/e) с черными беркширской масти первое поколение было однородно черно-пестрое по красному фону, а во втором наблюдалось классическое расщепление 3 : 1 на животных с черными пятнами и без черных пятен по красному фону. Объяснялось это тем, что свиньи беркширской масти являются гомозиготами E^P/E^P потенциально черно-пестрыми по красному фону, у которых в результате действия двух множеств генов-модификаторов площадь черных пятен увеличилась до состояния беркширской масти, а красный фон трансформировался в белый. При скрещивании таких свиней с красными комплексы рецессивных аллелей генов-модификаторов разрушаются, а поскольку этих модификаторов множество, то вероятность восстановления исходного генотипа во втором поколении практически нулевая (Волкопялов и др., 1934). В настоящее время показано, что беркширскую масть контролирует locus *KITLG* (Wilkinson et al., 2013), а результаты экспериментов, проводившихся в первой половине прошлого века, объяснимы и без привлечения гипотезы о генах-модификаторах (см. табл. 2). Животные беркширской масти в стаде мини-свиней ИЦиГ встречаются редко, и, как правило, этот признак сочетается с широко распространенным в изучаемой группе признаком «белая морда», который контролируется локусом *KIT*. Однако если пегости,

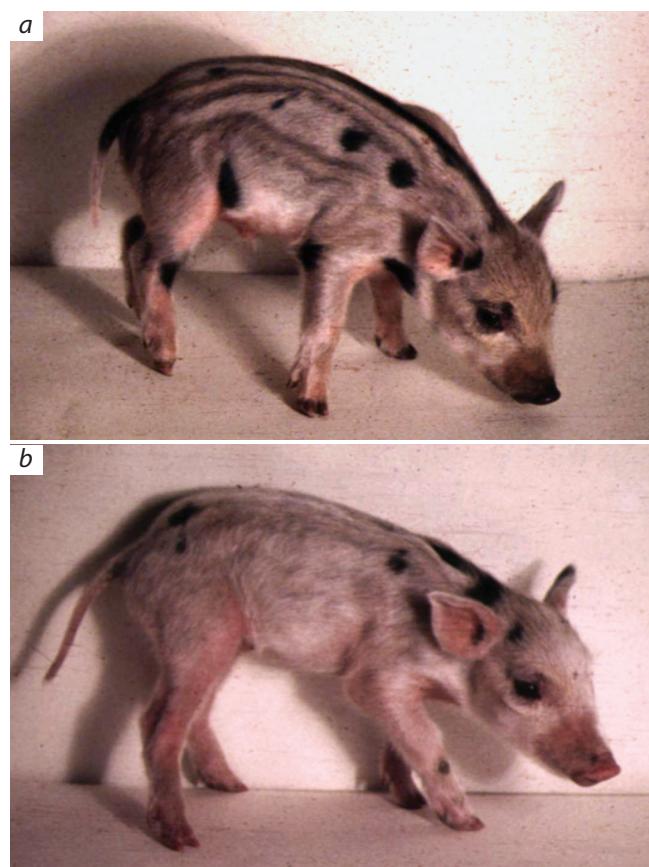


Fig. 3. Black-and-white-spotted piglets colored agouti with genotype. *a*, brown; *b*, light-gray. Photo by S. Knyazev.

детерминируемые локусом *KIT* (белая морда, белые ноги и белое брюхо), встречаются и у животных масти агути, то шесть характерных для беркширской породы белых точек наблюдались только у особей черной масти. Особое внимание привлекают особи, которые при рождении имеют очень темную ливрею, состоящую из темно-коричневых и черных полос, а в годовалом возрасте – черную беркширскую масть (рис. 5). Вероятно, в данном случае имеет место взаимодействие аллелей локусов *ASIP*, *MC1R* и *KITLG*, при котором формируется своеобразный фенотип, включающий ювенильную форму масти агути (ливрею) и беркширскую масть. Можно предположить, что в отличие от беркширов и других пород аналогичной окраски, которые имеют по локусу *MC1R* генотип E^P/E^P , наблюдаемые у мини-свиней ИЦиГ «ливрейные беркширы» могут иметь генотипы E^+/E^+ или E^+/E^P .

Белая. Белая щетина на лишенной пигмента коже, пигментированные глаза. Белая масть характерна для большинства заводских пород (Волкопялов и др., 1934; Ollivier, Sellier, 1982; Кабанов, Терентьева, 1985). Существуют варианты белой масти, когда на белом фоне присутствуют окрашенные участки (Kronacher, 1924; Hetzer, 1954; Бутарин, 1964; Харинг, 1965; Тихонов, Ратиани, 1974; Ollivier, Sellier, 1982; Никитин, Ворожейкин, 1994; Fontanesi, Russo, 2013). В 1906 г. было показано, что эпи-

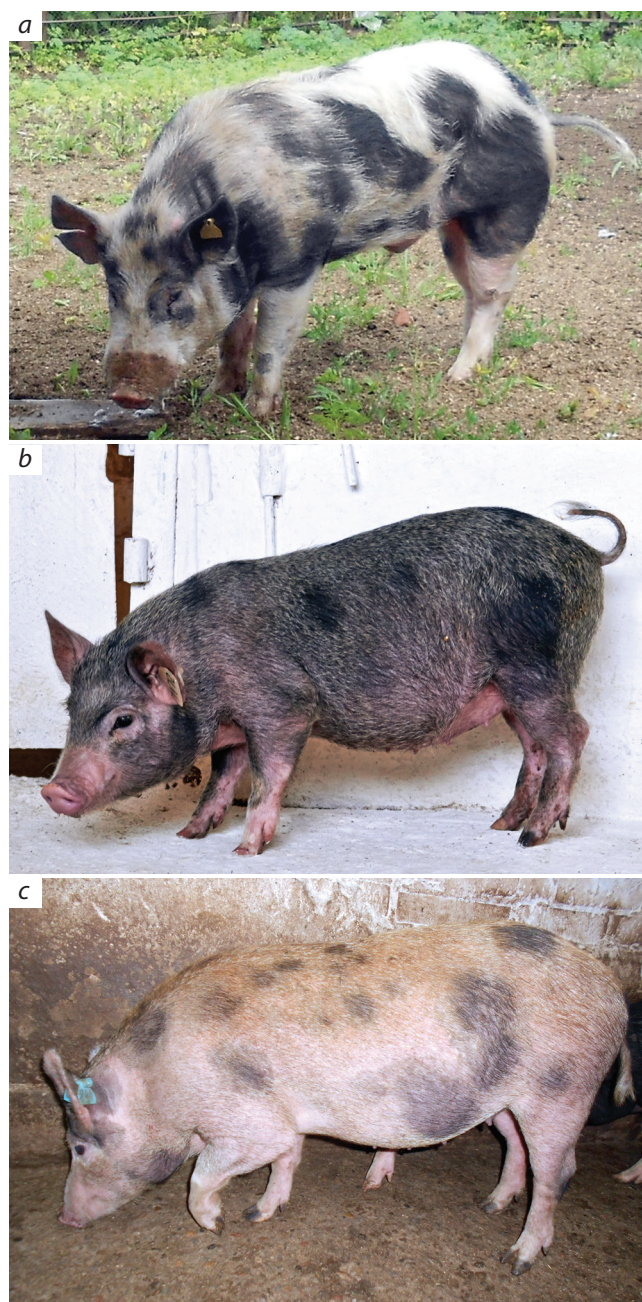


Fig. 4. Background colors variants amongst black and white ICG mini-pigs with genotype E^P/E^P :

a, white; *b*, darkish gray roan; *c*, reddish roan. Photos *a* and *c* by K. Shatokhin. Photo *b* by V. Koval.

статическую белую масть детерминирует доминантный аллель *I* гена *Inhibitor of color* (*White*), в то время как рецессивный аллель *i* отвечает за наличие пигментации (Волкопялов и др., 1934). В дальнейшем это было неоднократно подтверждено (Wentworth, Lush, 1923; Hetzer, 1945a–d). В настоящее время молекулярно-генетическими методами показано, что за белую масть отвечают три аллеля I^1 , I^2 и I^3 локуса *KIT* с тождественным гено- и фенотипическим эффектом, которые подавляют проявления остальных локусов, контролирующих окраски свиней



Fig. 5. Berkshire colored pig (*KITLG* locus) with a juvenile liver, is likely to be homozygous for the recessive allele of “white face” at the *KIT* locus.

Photo by V. Koval.



Fig. 6. ICG mini-piglets; (a, c) of complete white color and (b, d) spotted color.

Spots are indicated by arrows. Photo by K. Shatokhin.

(Pielberg et al., 2002; Fontanesi, Russo, 2013), и способны формировать (любой из них) либо полностью белую, либо белую с наличием пигментированных участков окраску (Pielberg et al., 2002; Lai et al., 2007; Fontanesi et al., 2010; Fontanesi, Russo, 2013) (рис. 6).

Присутствие окрашенных участков на белом фоне связывают с гетерозиготностью локуса *KIT*. Это было доказано в конце прошлого века гибридологическим методом, сам же признак по наиболее типичному своему проявлению был назван «серые пятна» (Никитин, Ворожейкин, 1994). Таким типичным проявлением являются, как правило, серые участки кожи, расположенные в любых возможных сочетаниях около глаз, у основания хвоста и/или на крестце (см. рис. 6). Обязательные для признака точки пигментации могут сопровождаться случайно расположенными отдельными пятнами, нередко более интенсивной окраски (см. рис. 6 и 7). Кроме того, встречается вариант, когда кроме обязательных точек пигментации присутствует множество небольших округлых пятен на спине и боках, сливающихся в единое целое (рис. 8). Такое

проявление «серой пятнистости» в настоящее время известно как «зернистость» (Hirooka et al., 2002).

Было показано, что проявление признака «серые пятна» возможно только у гетерозигот *I/i* по гену *Inhibitor of color*, гомозиготных по рецессивному аллелю *sp* тесно сцепленного с ним гена *Spotted* (Никитин, Ворожейкин, 1994). Коэффициент рекомбинации между генами *Inhibitor of color* и *Spotted* составил $0,053 \pm 0,057$, т. е. фактически не отличается от нуля (Никитин, Ворожейкин, 1994). Это может означать, что они являются сублокусами локуса *KIT*, один из которых подавляет меланогенез (*Inhibitor of color*), а другой частично его восстанавливает (*Spotted*).

Источником аллелей белой масти для мини-свиней ИЦиГ могли быть свиньи пород крупная белая и ландрас, а также светлогорские мини-свиньи (Шатохин и др., 2014), поэтому не исключено наличие в стаде более одного доминантного аллеля локуса *KIT*. Однако, с учетом малочисленности родоначальников селекционной группы (Никитин и др., 2014), вероятность этого мала. Таким образом, мини-свиньи ИЦиГ чисто белой масти могут иметь генотип $I^+/Sp/\dots$, а белые с пятнами – генотип $I^+/sp/i-sp$. Как показал анализ происхождения и результаты скрещиваний, все белые особи, входящие в репродуктивное ядро селекционной группы, являются гетерозиготами I^+/i .

Ювенильная ливрея. Ливрея, как и зонарность распределения пигментов в волосе, является атрибутом сложной окраски дикого типа. Масть дикого типа – агути у свиней – всегда включает ювенильную ливрею. В то же время у свиней грязно-белой (i^m/i^m) и белой (I/i) масти также может присутствовать ливрея, пусть и в трансформированном виде (Волкопялов и др., 1934; Ollivier, Sellier, 1982). Именно поэтому возникла необходимость рассмотреть ювенильную ливрею отдельно.

Поросята породы венгерская мангалица имеют ливрею, состоящую из черных и белых полос, тогда как взрослые – белую щетину на пигментированной коже (Волкопялов и др., 1934; Кабанов, Терентьева, 1985). У белых поросят – потомков дикого кабана и свиней белой масти – неод-

нократно отмечали полосатость структурного типа, зависящую от характера и расположения щетины (Kronacher, 1924; Dechambre, 1925, 1926; Бромлей, Кучеренко, 1983). Сходную структурную полосатость с ослабленной пигментацией, сопровождающую признак «серые пятна», наблюдали и авторы настоящей статьи у потомков скрещиваний белых свиней породы ландрас с европейским (*Sus scrofa scrofa*) и уссурийским (*S. s. ussuricus*) дикими кабанями (рис. 9). Такая ослабленная чалая серо-белая или серо-желтая ливрея могла присутствовать или отсутствовать у отдельных поросят с серыми пятнами (генотип $I\text{-}sp/i\text{-}sp$) и никогда не наблюдалась у особей без серых пятен. Еще один вариант ливреи описан в литературе под названием «призрачные полосы» (Волкопялов и др., 1934). Он представляет чередование продольных серебристых и матовых белых полос у свиней белой масти. Этот вариант также наблюдался нами как у ландрас-кабаний гибридов, так и у чистопородных ландрасов с генотипом I^2/I^2 .

С. Kronacher (1924) полагал, что ливрея наследуется независимо от окраски, как особый доминантный признак. G.K. Constantinescu (1933) также пришел к выводу, что ливрею у поросят и окраску взрослых животных детерминируют разные гены. Действие гена, отвечающего за ювенильную полосатость, по его мнению, сводилось к более сильной концентрации пигмента в волосах, расположенных продольными рядами и с возрастом выпадающих. Кроме того, он предположил существование гена – разбавителя черного пигмента. Предположения о детерминации ювенильной окраски свиней двумя генами также высказывали N.I. Teodoreanu (1935) и H.O. Hetzer (1945a–d). Анализ литературных данных, собственных наблюдений о проявлениях ювенильной ливреи и современных данных о локусах, контролирующих окраску свиней, указывает на то, что за формирование этого признака отвечают аллели локусов *ASIP* и *MC1R*. Очевидно, особи проявившие ювенильную ливрею, должны иметь аллель *A* локуса *ASIP* и аллель E^+ локуса *MC1R*, но не должны быть носителями аллеля E^D (табл. 3). Таким образом, подтверждается выдвинутая в первой половине XX в. гипотеза об участии двух генов в формировании ювенильной ливреи у свиней (Kronacher, 1924; Constantinescu, 1933; Teodoreanu, 1935; Hetzer, 1945a–d).

Следовательно, можно предположить, что у грязно-белых и белых свиней, проявивших ювенильную ливрею, генотипы по локусам *ASIP* и *MC1R* должны быть такими же, как у не белых (табл. 4). При этом проявление ливреи, очевидно, зависит от интенсивности синтеза ингибиторов меланина, что указывает на взаимодействие локусов *ASIP* и *MC1R* с локусом *KIT*.

У свиней с мастью дикого типа и генотипом i/i доминантные аллели I^1 , I^2 и I^3 , обеспечивающие синтез ингибиторов меланина, отсутствуют, соответственно ливрея у них – это продольные черные и коричневые или рыжие полосы. Свиньи породы мангалица, грязно-белой масти с генотипом i^m/i^m , проявляют ювенильную ливрею в виде черных и белых полос. Можно предположить, что у таких животных понижен синтез ингибиторов меланина и синтезируются главным образом белки, ингибирующие красный пигмент. Особый интерес представляют белые с «серыми пятнами» свиньи, гетерозиготные по одному



Fig. 7. A variant of “Gray Spotted” color in ICG mini-pigs (spot on the loin).

Photo by K. Shatokhin.



Fig. 8. A variant of “Gray Spotted” color in ICG mini-pigs (grained with a white belt and sporadic black spots).

Photo by K. Shatokhin.

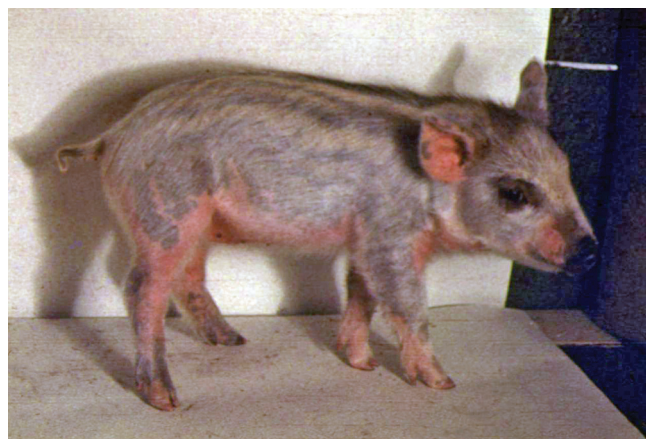


Fig. 9. Landrace × Wild Boar hybrid piglet with “gray spots”. Grain and gray-and-white juvenile livery.

Photo by S. Knyazev.

Table 3. Juvenile livery color manifestation in nonwhite pigs

Color	<i>ASIP</i>	<i>MC1R</i>	<i>KIT</i>	Livery (Stripes)
Agouti	<i>A/...</i>	<i>E⁺/E⁺, E⁺/E^p, E⁺/e</i>	<i>i/i</i>	Wild Type
Recessive Black	<i>a/a</i>			No
Dominant Black	<i>.../...</i>	<i>E^D/...</i>		
Black and White		<i>E^p/E^p</i>		

Table 4. Juvenile livery color manifestation in white pigs

Color	<i>ASIP</i>	<i>MC1R</i>	<i>KIT</i>	<i>Spotted</i>	Stripes
Dingy white	<i>A/...</i>	<i>E⁺/E⁺, E⁺/E^p, E⁺/e</i>	<i>i^m/i^m</i>	?	Black and white
White with gray spots	<i>A/...</i>	<i>E⁺/E⁺, E⁺/E^p, E⁺/e</i>	<i>I²/i</i>	<i>sp/sp</i>	Grayish-white Grayish-yellow
White	<i>A/...</i>	<i>E⁺/E⁺, E⁺/E^p, E⁺/e</i>	<i>I²/...</i>	?	Shadowy
White	?	?	<i>I²/...</i>	?	No

из доминантных аллелей локуса *KIT* (*I¹*, *I²*, *I³*) и гомозиготные по рецессивному аллелю гена *Spotted* (*sp/sp*). Очевидно, у них снижен уровень синтеза ингибиторов меланина, что, собственно, и позволяет реализоваться фенотипу «серые пятна». Однако при этом ювенильная ливрея у особей с «серыми пятнами» имеет три хорошо различающиеся формы проявления: серые и желтоватые полосы, серые и белые полосы и полное отсутствие полос. Поскольку ливрея особи формируется в пренатальный период онтогенеза, эти три формы можно классифицировать следующим образом:

- 1) серые и желтые полосы – в пренатальный период снижение синтеза ингибиторов черного и красного пигмента различается незначительно;
- 2) серые и белые полосы – в пренатальный период снижение синтеза ингибиторов черного пигмента сильнее, чем красного;
- 3) полное отсутствие полос – снижение синтеза ингибиторов меланина отсутствует.

Данная классификация наводит на мысль о том, что доминантные аллели локуса *KIT* *I¹*, *I²* и *I³* могут быть не полностью тождественны, что и проявляется у гетерозигот *I²/i* в пренатальный период на фоне гомозиготности по рецессивному аллелю гена *Spotted*. Однако эта гипотеза требует проверки с применением молекулярных методов.

В случае с белыми свиньями, у которых отсутствует ювенильная ливрея (см. табл. 3), возможны следующие объяснения:

- 1) отсутствие аллелей *A* и *E⁺* локусов *ASIP* и *MC1R* соответственно;
- 2) гомозиготность по аллелю *E^p* локуса *MC1R*;
- 3) присутствие аллеля *E^D* локуса *MC1R*.

Действие двух первых причин несомненно. Существуют породы, у которых распространен аллель *a* локуса *ASIP* (Ollivier, Sellier, 1982), а поскольку такие породы участвовали в выведении современных белых пород

(Волкопялов и др., 1934), то гомозиготность *a/a* у последних вполне вероятна. Аллель *E^p* локуса *MC1R* широко распространен у белых пород, на что указывает неоднократно описанное в литературе рождение черно-пестрых поросят во втором и последующих поколениях скрещиваний белых и окрашенных пород (Buchanan-Smith et al., 1935). В частности, по нашим собственным наблюдениям, среди ландрас-кабаньих гибридов при разведении «в себе» наиболее часто выщеплялись черно-пестрые особи, гораздо реже – масти дикого типа (единичные случаи) и никогда не было поросят черной масти. Последнее указывает на меньшую вероятность того, что у белых пород отсутствие «призрачной» ювенильной ливреи обусловлено действием аллеля *E^D* локуса *MC1R*. Кстати, пород с доминантной черной мастью существует достаточно мало, а их участие в формировании белых пород, если оно и было, весьма незначительно (Кабанов, Терентьева, 1985).

У мини-свиней ИЦиГ ливрея представлена у животных масти агути, но изредка встречается у гетерозигот *I/i* с «серыми пятнами». Как правило, это серые чалые и белые полосы. Причиной редкого проявления ювенильной ливреи у мини-свиней могут быть высокие частоты аллелей *E^D* и *E^p* локуса *MC1R* – около половины поголовья имеет доминантную черную или черно-пеструю масть.

Сепия. Влияет на интенсивность пигментации волос и радужной оболочки глаз. Осветление окраски происходит в результате объединения гранул меланина в нерегулярно расположенные глыбки, что ведет к ослаблению абсорбции света, вследствие чего черная окраска кажется серой. Собираение гранул в глыбки сопровождается изменениями отростков меланоцитов (Searle, 1968; Brumbaugh et al., 1972). Известны два мнения о генетическом контроле данного варианта окраски свиней. Согласно первому, сепию должен детерминировать аллель *a^s* гена *Agouti* (Berge, 1961). Позднее был предложен отдельный ген *Dilution* с двумя аллелями: *D* – нормальная пигментация и *d* – ослабленная (Searle, 1968).

У мини-свиней ИЦиГ изредка рождаются особи с ослабленной пигментацией. Это поросята сильно осветленной масти агути с характерной ливреей (см. рис. 3), которые во взрослом состоянии имеют светло-серую масть. Не исключена вероятность того, что это гомозиготы *d/d* по гену *Dilution*, но такому предположению препятствует отсутствие подобных осветленных особей без ювенильной ливреи. То есть описанный вариант сепии скорее соответствует гомозиготности по аллелю *a^s* гена *Agouti*, как в свое время предлагал S. Berge (1961).

Однако среди мини-свиней ИЦиГ масти агути встречаются серые особи с различной интенсивностью пигментации, варьирующей от светло- (сепия?) до темно-серой, поэтому второе предположение тоже кажется сомнительным. Скорее всего, «сепия» мини-свиней ИЦиГ – результат взаимодействия генов-модификаторов с аллелем *E⁺* локуса *MC1R*, а истинная, описанная в литературе сепия (см. табл. 1) в исследуемой селекционной группе отсутствует.

Серая масть редко встречается у современных домашних свиней и потому слабо изучена (Ollivier, Sellier, 1982; Fontanesi et al., 2012). Тем не менее некогда она была распространена у примитивных европейских пород (Иванчук, 2011). В настоящее время серые свиньи описаны в популяции Nero Siciliano (Fontanesi et al., 2012). Молекулярно-генетическими методами показано, что серую масть может детерминировать аллель *I^{Rn}/I^d* локуса *KIT* (Fontanesi et al., 2012). Однако ранее существовало вполне обоснованное мнение, что серая масть у свиней контролируется одним из аллелей локуса агути (Berge, 1961). Противоречие между этими гипотезами, впрочем, легко разрешимо, если допустить, что исследователи изучали разные варианты серой масти. Масть можно классифицировать как серую, если она представляет результат смешения черных и белых волос (чалость), и в этом случае ее вполне может контролировать локус *KIT*. В то же время серая масть может быть и результатом утраты красного пигмента волосом зонарного дикого типа (агути). Такую серую масть вполне может контролировать один из аллелей гена *Agouti*, или, что более вероятно, имеет место взаимодействие аллелей локусов *MC1R*, *ASIP* и генов-модификаторов.

Следует заметить, что термин «серая масть» некорректен и может трактоваться весьма широко. Например, мексиканские безволосые свиньи, имеющие очень редкую и тонкую щетину, могут быть черного или серо-голубого цвета (Тихонов, 2010). В данном случае серо-голубой цвет является результатом преломления световых лучей во внешнем ороговевшем полупрозрачном слое кожи. У мини-свиней ИЦиГ черной масти такое «посерение» и «поголубение» кожных покровов часто наблюдается во время линьки после выпадения щетины. Поэтому разрешение вопросов, связанных с серой мастью и ее формами, требует дальнейших исследований при четком определении того, какой же все-таки конкретный фенотип называют «серой мастью».

В группе мини-свиней ИЦиГ под определение «серая масть» попадают три генотипически, фенотипически и визуально различающиеся окраски. Эти окраски являются естественными внутригрупповыми вариантами трех фенотипов масти и, соответственно, не могут быть от них

обособлены, а потому рассматривались при описании основной масти в качестве одной из ее вариаций.

1. Крайнее выражение признака «серые пятна». Животные имеют обширные участки пигментированной, серой или голубовато-серой кожи, покрытые смесью черных и белых волос (см. рис. 8 и 9). В данном случае можно уверенно утверждать, что формирование признака контролировали аллели локуса *KIT* и тесно сцепленного с ним гена *Spotted*.
2. Черно-пестрые животные с основным серым фоновым цветом (см. рис. 4, б). Серый фон создается в результате смешения белых и пигментированных волос, последние окрашены по типу агути. Черно-пестрость может проявляться только у животных, гомозиготных по рецессивному «дикому» аллелю *i* локуса *KIT*. Собственно говоря, этим и ограничивается его участие в формировании данного варианта окраски. В этом случае серый фон может быть результатом действия локусов *MC1R*, *EDNRB*, а также их взаимодействия с какими-то генами-модификаторами.
3. «Серые агути» (см. рис. 1 и 3). Можно предположить, что это результат взаимодействия аллелей локусов *ASIP* и *MC1R* с генами-модификаторами.

Пегости. Одним из элементов окраски домашних животных являются пегости – белые, упорядоченно локализованные пятна на окрашенном фоне (Searle, 1968). У свиней встречаются следующие разновидности пегостей: белый пояс, белые ноги, белое брюхо, белая морда, беркширская масть. Беркширская масть уже рассмотрена нами выше, поэтому перейдем к остальным вариантам пегостей. Белым поясом называется пересекающая тело животного белая полоса, ширина которой может варьировать от нескольких сантиметров до полностью белой середины туловища.

У мини-свиней ИЦиГ данный признак не обнаружен, но иногда встречается вариант признака «серые пятна», внешне имитирующий признак «белый пояс» (см. рис. 8). Ранее мы неоднократно наблюдали этот вариант «серых пятен» у ландрас-кабаний гибридов. В обеих селекционных группах (мини-свиньи ИЦиГ и ландрас-кабаний гибриды) это всегда были животные с генотипом *I⁺/i sp/sp*; передача «псевдопояса» от родителей потомкам не наблюдалась. Предполагают, что остальные разновидности пегости, за исключением беркширской масти, детерминируют рецессивные аллели локуса *KIT* (Giuffra et al., 1999; Fontanesi et al., 2010; Fontanesi, Russo, 2013). Все они широко распространены у мини-свиней ИЦиГ и встречаются как по отдельности, так и в различных сочетаниях (см. рис. 1 и 5).

Заключение

У мини-свиней ИЦиГ не были обнаружены грязно-белая, альбиностическая белая, красная, коричневая, рецессивная черная масти и белый пояс, так как эти окраски либо редки, либо специфичны для пород, которые не участвовали в их формировании (Шатохин и др., 2014). Присутствие окраски сепия в исследуемой селекционной группе сомнительно, хотя и не исключено.

В целом оценка фенотипического разнообразия окрасок мини-свиней ИЦиГ показала присутствие четырех

основных мастей, каждая из которых включала в себя различающиеся варианты:

1. Масть агути включает две последовательности вариантов:
 - а) дикий тип → ... → серая;
 - б) дикий тип → ... → темная, почти черная.
2. Варианты черно-пестрой масти различаются цветом основного фона, который может быть белым с небольшой примесью черных волос (слабовыраженная чалость); серым чалым с голубоватым оттенком; кирпичным, после года превращающимся в серый чалый.
3. Черная масть – доминантная черная и беркширская масть.
4. Белая масть – чисто-белая и белая с пятнами.

Отсутствие в стаде мини-свиней ИЦиГ рецессивной черной масти позволяет утверждать, что они мономорфны по локусу *ASIP* и имеют гомозиготный генотип *A/A*. По локусу *MC1R* исследуемая совокупность полиморфна: в ней присутствуют аллели $E^{D^?}$, E^+ и E^P . Поскольку возможных источников доминантной черной масти было два – светлогорские мини-свиньи и вьетнамская черная вислорюхая пастбищная порода, то до проведения молекулярно-генетического анализа нельзя исключить, что в стаде присутствуют оба аллеля – E^{D^1} и E^{D^2} . Разнообразие основной фоновой окраски у черно-пестрых мини-свиней указывает на полиморфизм по локусу *EDNRB*. Возможных источников эпистатической белой масти у мини-свиней ИЦиГ было три: крупная белая и ландраасская породы, светлогорские мини-свиньи, поэтому не исключено присутствие более одного доминантного аллеля полной депигментации (белой масти) локуса *KIT*. Кроме того, присутствуют три аллеля частичной депигментации: «белая морда», «белые ноги», «белое брюхо» и аллель полной пигментации – *i*. Аллели, детерминирующие признаки «серые пятна» и «зернистость», мы исключили из предполагаемых аллелей локуса *KIT*, так как было показано, что данные признаки формирует рецессивный аллель тесно сцепленного с *KIT* локуса *Spotted* (см. табл. 1). Соответственно, по локусу *Spotted* в исследуемой совокупности выявлено два аллеля: *Sp* и *sp*. Наличие в стаде мини-свиней ИЦиГ особей с беркширской мастью свидетельствует о полиморфизме локуса *KITLG*. Кроме того, цветовые вариации масти агути указывают на вероятное действие двух групп модификаторов, одна из которых изменяет в шерсти животных концентрацию красного пигмента, а вторая – черного.

В целом исследование показывает, что малочисленная и высокоинбредная селекционная группа мини-свиней ИЦиГ (Никитин и др., 2014) обладает высоким фенотипическим разнообразием окрасок, несмотря на то что отбор, направленный на поддержание окрасочного полиморфизма, не проводился. В сочетании с тем, что особи воспроизводящего состава большей частью гетерозиготны по аллелям локусов *KIT* и *MC1R*, вполне возможна связь масти с адаптивностью и жизнеспособностью, что требует дальнейшего, более целенаправленного изучения.

Acknowledgments

This work was supported in part by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andersson L., Plastow G. Molecular genetics of coat colour variation. The Genetics of the Pig. 2nd edition (Eds. M.F. Rothschild, A. Ruvinsky). CAB International, 2011:38-50.
- Berge S. Heredity of colour in pigs (in Norwegian). Tidsskr. Norske Landbr. 1961;68:159-188.
- Bromley G.F., Kucherenko S.P. Kopytnye yuga Dalnego Vostoka SSSR [The Ungulates of the Soviet Far East]. Moscow, 1983. (in Russian)
- Brumbaugh J.A., Chatterjee G., Hollander W.F. Adendritic melanocytes: A mutation in linkage group II of the fowl. J. Heredity. 1972;63(1):19-25.
- Buchanan-Smith A.D., Robison O.J., Bryant D.M. The Genetics of the Pig. Univ. of Edinburgh, Institute of Animal Genetics, 1935.
- Butarin N.S. Otdalennaya gibrizatsiya v zhivotnovodstve [Remote hybridization in animal breeding]. Alma-Ata, 1964. (in Russian)
- Carrion D., Day A., Evans A., Mitsuhashi T., Archibald A., Haley C., Andersson L., Plastow G. The use of *MC1R* and *KIT* genotypes for breed characterization. Arch. Zootec. 2003;52:237-244.
- Carr-Saunders A.M. Note on inheritance in swine. Science. 1922;55:19.
- Charing F. Porody sviney v drugih stranakh Zapadnoy i Yuzhnoy Evropy. Rukovodstvo po razvedeniyu zhivotnykh [Pig Breeds in Countries of Western and Southern Europe. Animal husbandry manual]. Moscow, 1965;3:45-98. (in Russian)
- Constantinescu G.K. Vererbungsversuche an Schweinen unter besonderer Berücksichtigung des Mangalitzaschweines. Z. Zucht. 1933; 26:395-427.
- Danilkin A.A. Svinie (Suidae). Mlekopitayushchie Rossii i sopredelnykh regionov [Pigs (Suidae). Mammals of Russia and neighboring regions]. Moscow, 2002. (in Russian)
- Dechambre P. L'hybridation du sanglier et du porc. Revue Hist. Nat. Appl. 1925;6:207-212.
- Dechambre P. Etudes genetiques sur les porcs et les sangliers. Recl. Med. Vet. Ec. Alfort. 1926;105:129-184.
- Drögemüller C., Giese A., Martins-Wess F., Wiedemann S., Andersson L., Brenig B., Fries R., Leeb T. The mutation causing the black-and-tan pigmentation phenotype of Mangalitz pigs maps to the porcine *ASIP* locus but does not affect its coding sequence. Mammalian Genome. 2006;17:58-66.
- Fang M., Larson G., Ribeiro H.S., Li N., Andersson L. Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. PLoS Genetics. 2009;5:e1000341.
- Fernandez A., Silio L., Rodriguez C., Ovilo C. Characterization of OCA2 cDNA in different porcine breeds and analysis of its potential effect on skin pigmentation in a red Iberian strain. Animal Genetics. 2006;37:166-170.
- Fontanesi L., D'Alessandro E., Scotti E., Liotta L., Crovetto A., Chiofalo V., Russo V. Genetic heterogeneity and selection signature at the *KIT* gene in pigs showing different coat colours and patterns. Animal Genetics. 2010;41:478-492.
- Fontanesi L., D'Alessandro E., Scotti E., Liotta L., Chiofalo V., Russo V. Analysis of the *KIT* gene in a Sicilian pig population and identification of the I^d allele at the *Dominant white* locus. (Eds. E.J. De Pedro, A.B. Cabezas). 7th Intern. Symp. on the Mediterranean Pig. Zaragoza: CIHEAM, 2012;25-29.
- Fontanesi L., Russo V. Molecular genetics of coat colour in pigs. Acta Agriculturae Slovenica, Ljubljana. 2013;4:15-20.
- Giuffra E., Evans G., Tornsten A., Wales R., Day A., Looft H., Plastow G., Andersson L. The *Belt* mutation in pigs is an allele at the *Dominant white (I/KIT)* locus. Mammalian Genome. 1999;10: 1132-1136.
- Hetzler H.O. Inheritance of coat color in swine. I. General survey of major color variations in swine. J. Heredity. 1945a;36:121-128.

- Hetzer H.O. Inheritance of coat color in swine. II. Result of Landrace by Poland China crosses. *J. Heredity*. 1945b;36:187-192.
- Hetzer H.O. Inheritance of coat color in swine. III. Result of Landrace by Berkshire crosses. *J. Heredity*. 1945c;36:255-256.
- Hetzer H.O. Inheritance of coat color in swine. IV. Analysis of hybrids of Landrace and Large Black. *J. Heredity*. 1945d;36:309-312.
- Hetzer H.O. Inheritance of coat color in swine. V. Results of Landrace by Duroc-Jersey crosses. *J. Heredity*. 1946;37:217-224.
- Hetzer H.O. Inheritance of coat color in swine. VII. Results of Landrace by Hampshire crosses. *J. Heredity*. 1948;39:123-128.
- Hetzer H.O. Effectiveness of selection for extension of black-spotting in Beltsville No. 1 swine. *J. Heredity*. 1954;45:215-223.
- Hirooka H., de Koning D.J., van Arendork J.A.M., Harlizius B., Groot P.N., Bovenhuis H. Genome scan reveals new coat color loci in exotic pig cross. *J. Heredity*. 2002;93(1):1-8.
- Ivanchuk V.A. Biogenetic features of rare swine breeds. *Veterinariya selskokhozyaystvennykh zhivotnykh = Veterinary of livestock*. 2011;2:55-60. (in Russian)
- Kabanov V.D., Terentyeva A.S. *Porody sviney [Pig Breeds]*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)
- Kijas J.M., Moller M., Plastow G., Andersson L. A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*. 2001;158:779-785.
- Kijas J.M.H., Wales R., Törnsten A., Chardon P., Moller M., Andersson L. Melanocortin receptor (*MC1R*) and coat color in pigs. *Genetics*. 1998;150:1177-1185.
- Kosswig C., Ossent H.P. Die Vererbung der Haarfarben beim Schwein. *Lucht*. 1931;22:297-381.
- Kozlo P.G. *Opredelenie vozrasta, selektsiya i otlov dikogo kabana [Age Determination, Selection, and Entrapment of Wild Boars]*. Minsk, Uradszhay Publ., 1973. (in Russian)
- Kronacher C. Vererbungsversuche und Beobachtungen an Schweinen. *Z. Indukt. Abstamm. u. Verer. Lehre*. 1924;34:1-120.
- Lai F., Ren J., Ai H., Ding N., Ma J., Zeng D., Chen C., Gou Y., Huang L. Chinese white Rongchang pig does not have the dominant white allele of *KIT* but has the dominant black allele of *MC1R*. *J. Heredity*. 2007;98(1):84-87.
- Lauvergne J.J., Malynicz G.L., Quartermain A.R. Coat colour variants of village pigs in Papua New Guinea. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 1982;14:29-42.
- Legault C. Genetics of colour variation. *The Genetics of the Pig* (Eds. M.F. Rothschild, A. Ruvinsky). CAB International, Wallingford, UK, 1998;51-69.
- Lightner J.K. Genetics of coat colour: the agouti signaling protein (*ASIP*) gene. *Answers Res. J.* 2009;2:79-84.
- Lush J.L. Inheritances in swine. *J. Heredity*. 1921;12:57-71.
- Mao H., Ren J., Ding N., Xiao S., Huang L. Genetic variation within coat color genes of *MC1R* and *ASIP* in Chinese brownish red Tibetan pigs. *Animal Sci. J.* 2010;81(6):630-634.
- Mayer J.J., Brisbin I.L. Distinguish wild feral hogs from introduced wild boar and their hybrids: a review of past and present efforts. *Feral Swine: A Compendium for Resource Managers* (Eds. C.W. Hanselka, J.F. Cadenhead). San Angelo, TX: Texas Agric. Extension Service, 1993;28-49.
- McCann B., Davie D.K., Feldhamer G.A. Distribution, habitat use, and morphotypes of Feral Hogs (*Sus scrofa*) in Illinois. *Transactions of Illinois State Academy of Science*. 2003;96(4):301-311.
- Meynhardt H. *Vier Jahre unter Wildschweinen*. Leipzig, 1978.
- Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S. Miniature pigs of ICG as a model object for morphogenetic research. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2014;4(6):511-522.
- Nikitin S.V., Lobkov J.I. A lethal allele of pigs Spotted gene. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1996;32(8):1119-1125. (in Russian)
- Nikitin S.V., Vorozheikin A.S. Features of the inheritance of gray spots in domestic pigs. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1994;30(5):675-680. (in Russian)
- Ollivier L., Sellier P. Pig genetics: a review. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 1982;14(4):481-544.
- Ossent H.P. Rezessives Weiß und Frischlingsstreifung der Mangalitzaschweine. *Züchter*. 1929;1:11-13.
- Pielberg G., Olsson C., Syvanen A.C., Andersson L. Unexpectedly high allelic diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics*. 2002;160:305-311.
- Ren J., Mao H., Zhang Z., Xiao S., Ding N., Huang L. A 6-bp deletion in the *TYRP1* gene causes the brown colouration phenotype in Chinese indigenous pigs. *Heredity*. 2011;64(106):862-868.
- Searle A.J. *Comparative genetics of coat color in mammals*. London; New York, 1968.
- Shatokhin K.S., Deeva V.S., Goncharenko G.M., Gryshina N.B., Goryacheva T.S., Akulich E.G., Kononenko E.V., Yermolaev V.I., Nikitin S.V. Genetic features of ICG miniature pigs. *Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University*. 2014;30(1):75-81. (in Russian)
- Teodoreanu N.I. Vererbungsbeobachtungen über die Farbe des roten und des schwarzen Mangaliczaschweines. *Anal. Acad. Române (Men. Sect. Stiint.)*. 1935;10. Men.11:20.
- Tikhonov V.N. *Laboratornye mini-svini: genetika i mediko-biologicheskoe ispolzovanie [Laboratory mini-pigs: Genetics and Medicobiological Usage]*. Novosibirsk, Institute of Cytology and Genetics of SB of RAS Publ., 2010. (in Russian)
- Tikhonov V.N., Ratiany D.P. The hybridological study of coat color and blood group genetics of landrace and Vietnamese pig breeds. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1974;10(1):53-61. (in Russian)
- Volkopyalov B.P., Lus J.J., Schulzhenko I.F. *Porody, genetika i selektsiya sviney [Pig Breeds, Genetics and Breeding]*. Moscow; Leningrad, 1934. (in Russian)
- Vsevolodov E.B., Kaldybaev S.U., Latynov I.F. *Pigmentatsiya volosyanogo pokrova dikikh, domashnikh i gibridnykh sviney [Coat color pigmentation in wild, domestic, and hybrid pigs]*. *Morfologiya i genetika gibridnykh sviney [The Morphology and Genetics of Hybrid Pigs]*. Moscow, 1992;42-47. (in Russian)
- Wentworth E.N., Lush J.L. Inheritance in swine. *J. Agric. Res.* 1923;23:557-582.
- Wilkinson S., Lu Z.H., Megens H.J., Archibald A.L., Haley C., Jackson I.J., Groenen M.A., Crooijmans R.P., Ogden R., Wiener P. Signatures of diversifying selection in European pig breeds. *PLoS Genetics*. 2013;9:e1003453.

Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров *R*-генов устойчивости

О.Ю. Антонова¹, Н.А. Швачко¹, Л.Ю. Новикова¹, О.Ю. Шувалов¹, Л.И. Костина¹, Н.С. Клименко¹, А.Р. Шувалова¹, Т.А. Гавриленко^{1, 2} 

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Санкт-Петербург, Россия

Изучено генетическое разнообразие российских сортов картофеля и сортов селекции стран ближнего зарубежья из коллекции ВИР, которые создавались в 1931–2015 гг. На основании результатов анализа полиморфизма 14 монолокусных ядерных микросателлитов (SSR) проведено генотипирование 113 селекционных сортов. Дополнительно изучено распространение у сортов восьми маркеров трех *R*-генов, вовлеченных в контроль устойчивости растений к двум карантинным объектам – золотистой картофельной нематодой *Globodera rostochiensis* и возбудителю рака картофеля *Synchytrium endobioticum*, которые локально встречаются в отдельных регионах Российской Федерации. У всех изученных сортов, устойчивых к патотипу 1 *S. endobioticum*, выявлен диагностический компонент маркера NI-25 гена *Sen1*, у восприимчивых сортов фрагмент NI-25₁₄₀₀ не обнаружен. Полученные результаты продемонстрировали различную эффективность маркеров генов *H1* и *Gro1-4*, детерминирующих устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*; наиболее перспективно использовать несколько маркеров для детекции нематодоустойчивых сортов. Результаты молекулярного скрининга с шестью маркерами генов *H1* и *Gro1-4* позволили детектировать у сортов шесть гаплотипов. Пять гаплотипов включали сорта с различными сочетаниями изученных маркеров, большинство (87,9 %) из этих сортов были устойчивы или слабо поражаемы нематодой. Наиболее многочисленный гаплотип H1/0 включал 76 сортов, у которых не было выявлено ни одного маркера генов *H1* и *Gro1-4*; 96,1 % из них были восприимчивыми к *G. rostochiensis*. Обсуждается связь между родословными сортов, временем их создания, составом гаплотипов и устойчивостью селекционных сортов к золотистой картофельной нематодой и возбудителю рака картофеля.

Ключевые слова: *Solanum*; картофель; SSR-генотипирование; MAS; *Globodera rostochiensis*; *Synchytrium endobioticum*.

Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes

O.Y. Antonova¹, N.A. Shvachko¹, L.Y. Novikova¹, O.Y. Shuvalov¹, L.I. Kostina¹, N.S. Klimenko¹, A.R. Shuvalova¹, T.A. Gavrilenko^{1, 2} 

¹ N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

The genetic diversity of potato varieties from the VIR collection was analyzed based on microsatellite analysis. These varieties have been bred in Russia and near-abroad countries since the 1931. Application of 14 highly polymorphic nuclear microsatellites (SSR) enabled the complete discrimination of all 113 varieties. Additionally, we have studied these varieties for the distribution of 8 DNA markers associated with three *R*-genes involved in the control of resistance to two quarantine objects: the potato wart *Synchytrium endobioticum* and golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*, which occur locally in some regions of the Russian Federation. All the analyzed varieties with resistance to *S. endobioticum* pathotype 1 revealed the diagnostic marker NI-25₁₄₀₀ of the *Sen1* gene and a few susceptible cultivars lost this diagnostic fragment. The tested markers of the *H1* and *Gro1-4* genes, which confer resistance to *G. rostochiensis* pathotype Ro1 revealed different predictiveness. In the molecular screening of potato varieties, it is better to use several markers of these genes. Results of molecular screening using six markers of the *H1* and *Gro1-4* genes allowed us to detect 6 haplotypes in the tested subset. Five haplotypes include varieties with different combinations of the markers tested, the majority (87.9 %) of these varieties were highly resistant or moderately resistant to *G. rostochiensis*.

The most numerous haplotype H1/0 included 76 varieties, which did not possess any marker; 96.1 % of these varieties were susceptible to *G. rostochiensis*. Predictive associations between haplotype content, wart and nematode resistance, pedigree and 'variety age' are discussed.

Key words: *Solanum*; potato; SSR-genotyping; MAS; *Globodera rostochiensis*; *Synchytrium endobioticum*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров *R*-генов устойчивости. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181

Среди ведущих мировых продовольственных культур возделываемый картофель (*Solanum tuberosum* L.) занимает четвертое место после пшеницы, риса, кукурузы, являясь наиболее важной незерновой культурой. В настоящее время в мире насчитывается более 7000 селекционных сортов картофеля, созданных в 18–21-м вв. усилиями селекционеров разных стран (Van Berloo et al., 2007). В коллекциях 24 центров генетических ресурсов растений 23 стран сохраняется около 11000 селекционных сортов (GCDT, 2006), при этом многие из них представлены дублетными образцами. В нашей стране мировую коллекцию сортов картофеля начал создавать в 1919 г. С.М. Букасов в Отделе прикладной ботаники Сельскохозяйственного ученого комитета при Совете народных комиссаров (ныне ВИР); в середине 20-го века она была самой полной коллекцией селекционных сортов картофеля в мире (Букасов, Камераз, 1959). В настоящее время в ВИР сохраняется около 2300 селекционных сортов картофеля, из них около 320 представлены сортами селекции России и стран ближнего зарубежья.

Разработка методов изучения генетического разнообразия и идентификации сортов существенно расширяет возможности регистрации, систематизации и структурирования коллекций. Методы идентификации селекционных сортов картофеля традиционно базируются на оценке морфологических и агрономических признаков растений в полевых коллекциях (Salaman, 1926; Stuart, 1937; Зайцева, 1965), однако при работе с большими выборками и идентификации сортов, сохраняемых *in vitro* и криоколлекциях, использование традиционных методов имеет определенные ограничения. В 1970-е годы для генотипирования сортов картофеля применялись биохимические маркеры (Loeschcke, Stegemann, 1966), в последние десятилетия для этих целей все шире используются различные ДНК-маркеры, например AFLP- (McGregor et al., 2000; Braun, Wenzel, 2004), ISSR- (Bornet et al., 2002; Gorji et al., 2011) и SSR-маркеры. Последние особенно часто включают в программы по генотипированию селекционных сортов (Kawchuk et al., 1996; Provan et al., 1996; Moisan-Thiery et al., 2005; Fu et al., 2009; Рыжова и др., 2010; Côté et al., 2013), а также в мониторинг генетического разнообразия коллекций культурных видов

картофеля (Spooner et al., 2007; Gavrilenko et al., 2010) в связи с хорошей воспроизводимостью результатов, кодоминантностью, высоким уровнем детектируемого полиморфизма и экономичностью. Применение стандартных наборов хромосом-специфичных SSR-маркеров, например PGI (potato genetic identification kit) (Ghislain et al., 2009), позволяет сопоставлять большие массивы данных, получаемых в разных лабораториях.

Совершенствование технологий полногеномного секвенирования привело к развитию метода SNP-генотипирования на высокоплотных биочипах, позволяющего проводить широкомасштабные исследования функционального полиморфизма. В целях изучения генетического разнообразия сортов картофеля этот подход только начинает использоваться (Uitdewilligen et al., 2013; Vos et al., 2015), оставаясь пока еще малодоступным для широкого применения в связи с высокой стоимостью. В то же время зарубежные селекционные центры давно и успешно используют методы маркер-опосредованной селекции (MAS) на основе использования различных типов ДНК-маркеров, ассоциированных с генами (QTL-локусами), вовлеченными в контроль хозяйственно ценных признаков (Gebhard et al., 2006; Gebhardt, 2013; Hirsch et al., 2014; Ramakrishnan et al., 2015). Изучение распространения в сортовом генофонде таких маркеров может предоставить дополнительную информацию для анализа родословных и оценки перспектив вовлечения сортов в дальнейший селекционный процесс.

Данная работа направлена на изучение полиморфизма микросателлитных локусов у отечественных сортов картофеля (селекции Российской Федерации и стран ближнего зарубежья) из коллекции ВИР. Дополнительно исследовано распространение в сортовом генофонде маркеров *R*-генов, детерминирующих устойчивость растений к двум карантинным объектам: золотистой картофельной нематодой (ЗКН) *Globodera rostochiensis* и возбудителю рака картофеля *Synchytrium endobioticum*.

В разных регионах Российской Федерации локально распространен только один патотип *G. rostochiensis* – Ro1 (Симаков и др., 2009; Limantseva et al., 2014) из пяти описанных в литературе (Kort et al., 1977; Ross, 1986). Устойчивость растений к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*

Table 1. DNA markers used in the molecular screening of cultivars

Gene	Chromosome	Marker	T m	Diagnostic fragment (bp)	Reference
Resistance to golden potato cyst nematode <i>Globodera rostochiensis</i> (pathotype Ro1)					
<i>H1</i>	V	57R	60	452	Schultz et al., 2012
<i>H1</i>	V	TG 689	55	141	Milczarek et al., 2011
<i>H1</i>	V	N146	55	506	Takeuchi et al., 2009
<i>H1</i>	V	N195	55	337	Takeuchi et al., 2009
<i>H1</i>	V	239E4left/AluI	51	120 + 230	Bakker et al., 2004
<i>Gro1-4</i>	VII	Gro1-4	58	602	Gebhardt et al., 2006
Resistance to potato wart <i>Synchytrium endobioticum</i> (pathotype 1)					
<i>Sen 1</i>	XI	NL25	60	1400	Gebhardt et al., 2006
<i>Sen 1</i>	XI	Sti 046	55	S: 223 bp R: null allele	Ballvora et al., 2011

обуславливает наличие доминантных аллелей генов *H1* и *Gro1*. Ген *H1* картирован на хромосоме V (Bakker et al., 2004), ген *Gro1* – на хромосоме VII (Barone et al., 1990; Ballvora et al., 1995). По результатам секвенирования выявлена сложная структура локусов *H1* (Finkers-Tomczak et al., 2011) и *Gro1* (Paal et al., 2004), которые содержат большое число полноразмерных и дефектных *RGL* (resistance gene homologues) копий. В кластере *Gro1* идентифицирован ген *Gro1-4*, детерминирующий устойчивость к патотипу Ro1 ЗКН (Paal et al., 2004).

Из 38 известных в Европе патотипов возбудителя рака картофеля (Baayen et al., 2006) в Российской Федерации распространен только один – патотип 1 (или обычный), который встречается очагами в отдельных районах страны (Khiutti et al., 2012). Устойчивость к этому патотипу *S. endobioticum* детерминирует доминантный аллель гена *Sen1*, который картирован на хромосоме XI (Hehl et al., 1999).

По результатам цитированных выше и других исследований разработан ряд маркеров генов *H1*, *Gro1-4* и *Sen1* для проведения MAS (табл. 1), которые были использованы в настоящей работе.

Материалы и методы

Использовали выборку из 113 селекционных сортов картофеля из коллекции ВИР. Выборка включала: 80 русских сортов (Алена, Алиса, Алмаз, Алый парус, Бежицкий, Брянская новинка, Брянский деликатес, Брянский красный, Брянский надежный, Брянский юбилейный, Букет, Вдохновение, Весна, Ветеран, Виза, Владикавказский, Волжский, Вятка, Голубизна, Горно-Уральский, Горянка, Даная, Детскосельский, Загадка, Загадка Питера, Ильинский, Искра, Кемеровский, Корневский, Крепыш, Кристалл, Ладожский, Лакомка, Лига, Лидер, Ломоносовский, Лорх, Любава, Накра, Нарымка, Наяда, Невский, Никулинский, Октябренок, Очарование, Памяти Осиповой, Петербургский, Победа, Погарский, Прибрежный, Рамзай, Резерв, Ресурс, Рождественский, Россиянка, Русская красавица, Сапрыкинский, Сентябрь, Синева, Сиреневый туман, Сказка, Скороплодный, Слава Брянщины, Снегирь, Сокольский, Столовый 19, Сударыня, Томич, Удача, Успех, Фаленский, Филатовский,

Хибинский ранний, Чайка, Чародей, Чароит, Шурминский-2, Эффект, Юбилей Жукова, Юбилейный Осетии) и 33 сорта ближнего зарубежья, в том числе: 20 белорусских (Альпинист, Архидея, Верас, Выток, Гарант, Гранат, Дина, Живица, Здабытак, Комсомолец-20, Ласунак, Лошицкий, Нарочь, Одиссей, Пригожий 2, Расинка (Расінка), Синтез, Сузорье, Темп, Явар), 10 украинских (Бородинский розовый, Гарт, Лыбидь, Незабудка, Пролисок, Ромашка, Румянка, Русалка, Украинский розовый, Эскаорт) и 3 сорта из бывших республик СССР (Заравшан, Прикульский ранний, Светлячок). 63 сорта выборки (или 56,3 %) входили в «Государственный реестр сортов и селекционных достижений РФ» 2015 года.

В молекулярном скрининге участвовали 109 сортов из перечисленных выше. Препараты ДНК четырех сортов (Брянский деликатес, Горно-Уральский, Слава Брянщины и Столовый 19) показали нестабильную амплификацию в SSR-анализе, поэтому эти сорта не вовлекались в молекулярный скрининг в связи с возможностью ложноположительных ответов при использовании SCAR-маркеров.

При проведении молекулярного скрининга сортов в выборку были включены дополнительные нематодоустойчивые образцы, которые служили положительным контролем амплификации диагностических фрагментов маркеров генов *H1* (сорт Sante) и *Gro1-4* (клон i-144844 образца k-12403 *S. gurlai*) (Limantseva et al., 2014). В качестве отрицательного контроля использовали поражаемые ЗКН сорта Невский и Bintje, а также восприимчивый к патотипу 1 *S. endobioticum* сорт Лорх (Khiutti et al., 2012). В ряде случаев у нас была возможность сопоставления спектров одноименных сортов из коллекции ВИР и из учреждений оригинаторов – Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и фирмы ЛиГа. [Авторы выражают благодарность д.с.-х.н. В.А. Лебедевой, к.с.-х.н. Н.М. Гаджиеву и к.с.-х.н. З.З. Евдокимовой за предоставленный материал.]

Выделение ДНК осуществляли из листьев полевых растений с использованием модифицированного нами метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013). В случае необходимости препараты дополнительно очищали от полифенольных соединений при помощи поливинил-полипирролидона.

SSR-анализ. Анализ ядерных монолокусных микросателлитов проводили с использованием хромосом-специфичных праймеров, отобранных по литературным источникам. Большинство праймеров входили в набор PGI (Potato Genetic Identification) (Ghislain et al., 2009). Дополнительно был использован праймер Sti046 (Feingold et al., 2005), который, согласно A. Ballvora с коллегами (2011), ассоциирован с геном *Sen1*, контролирующим устойчивость к патотипу 1 *S. endobioticum*. Условия проведения ПЦР в целом соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров, однако для большей специфичности в программы была добавлена функция Touchdown: в первом цикле температура отжига была на 5 °C выше требуемой и на протяжении пяти циклов понижалась на 1 °C на каждый цикл. Разделение ПЦР-продуктов выполняли в 6,5 % денатурирующих полиакриламидных гелях на приборе Li-Cor 4300S DNA Analyzer с лазерной детекцией фрагментов. В качестве стандартов молекулярного веса использовали маркеры фирмы Li-Cor “50-350 b.p.” (<https://www.licor.com>).

Расчет размеров фрагментов для каждого локуса проводили с использованием пакета программ Saga2. Наличие определенного амплифицированного фрагмента ДНК у данного генотипа обозначали цифрой «1», отсутствие – «0». Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использовали индекс PIC (polymorphic index content) $= 1 - \sum(p_i^2)$, где p_i – частота i аллеля, выявленного в данной выборке (Nei, 1973). Степень гетерозиготности изученных SSR-локусов у сортов определяли, согласно Н.А. Гаевскому (2002), по формуле:

$$H1 = 1 - 1/n,$$

где n – число аллелей в локусе. Фактическую гетерозиготность ($H2$) оценивали по суммарной частоте встречаемости генотипов с различным уровнем гетерозиготности изученных локусов – в состоянии дуплексов, триплексов, квадриплексов ($D + T + K$). Кластерный анализ проводили с помощью метода Weighted Neighbor Joining (WNJ) в программе DARwin5 (версия 5.0.158, <http://darwin.cirad.fr/>), расстояния рассчитывали по L. Dice (1945).

MAS. В табл. 1 приведены использованные в данной работе CAPS-, SCAR- и SSR-маркеры, ассоциированные с *R*-генами, детерминирующими устойчивость к ЗКН (патотип Ro1) и возбудителю рака картофеля (патотип 1). ПЦР проводили по стандартным методикам, температуры отжига соответствовали указанным в литературе (см. табл. 1). Программы для молекулярного скрининга были оптимизированы путем введения функции Touchdown. Все реакции при работе со SCAR-маркерами проводили не менее чем в трех повторностях. Для CAPS-маркера 239E4left/AluI использовали фермент AluI фирмы СибЭнзим, рестриктицию осуществляли в течение ночи, согласно протоколу фирмы-изготовителя. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2 % агарозных гелях в буфере TBE с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

Данные молекулярного скрининга сопоставлялись с опубликованными результатами вегетационных и полевых опытов Государственного испытания сортов на устойчивость к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) и к *S. endobioticum* (патотип 1) и с данными каталогов сортов раз-

ных лет. Отметим, что сорта, идентифицируемые по более жесткой российской шкале как слабопоражаемые (1–5 цист на корнях), по европейской шкале могут быть отнесены к устойчивым сортам (0–5 цист на корнях) (Симаков и др., 2009).

Результаты и обсуждение

Генетическое разнообразие селекционных сортов по данным SSR-анализа

Уровень полиморфизма изученных 14 SSR-локусов в выборке из 113 сортов оказался достаточно высоким: значения PIC варьировали от 0,544 (локус STG0025) до 0,837 (локус Sti046); число аллелей на локус варьировало от трех (STG0025) до 10 (локусы STM0037, Sti046), среднее значение составило 6,9 аллелей на локус (табл. 2). Показатели ожидаемой гетерозиготности (H_1) SSR-локусов сортов варьировали от 0,67 до 0,90; показатели фактической гетерозиготности (H_2) – от 0,36 до 1,00 (см. табл. 2).

Набор аллелей в изученных 14 SSR-локусах был индивидуален для каждого сорта, что позволило нам однозначно различить и генотипировать все сорта выборки. Однако следует учитывать, что при расширении объема генотипируемой выборки разрешающая способность в SSR-анализе только этих 14 маркеров может оказаться недостаточной.

По результатам кластерного анализа, выполненного на основании данных исследования полиморфизма 14 SSR-локусов, можно выделить до 12 групп (рис. 1), однако ни одна из них не имела статистической поддержки в силу низких значений бутстреп-коэффициентов. Сорта селекции разных стран объединялись в смешанные группы, что может указывать на интенсивный обмен селекционным материалом.

В отдельных случаях отмечена тенденция группирования сортов, созданных в одном учреждении-оригинаторе или одним коллективом селекционеров. Например, вместе группируются восемь сортов, созданных селекционерами Северо-Западного региона России из ЛенНИИСХ «Белогорка» и из фирмы «ЛиГа» (Невский, Чародей, Русская красавица, Сказка, Загадка Питера, Наяда, Вдохновение, Лига), или некоторые сорта, созданные в БелНИИКСХ (Альпинист, Нарочь, Одиссей, Явар). На дендрограмме можно выделить пары сортов (см. рис. 1), совместная кластеризация которых объясняется общим происхождением (например, сорта Удача и Любава; Детскосельский и Юбилей Осетии; Ресурс и Брянский красный; Лорх и Кореневский и др.). В то же время отдельные пары сортов (Слава Брянщины и Погарский; Удача и Украинский розовый; Никулинский и Горянка) группировались вместе с высокими значениями бутстреп-оценки, хотя данные их родословных эту кластеризацию не объясняют.

Суммарно из 96 аллелей 14 SSR-локусов 16 были редкими (их частота встречаемости не превышала 5 %) и 8 – уникальными (выявлены только у одного сорта данной выборки) (см. табл. 2). Редкие аллели обнаружены у 38 (33,6 %) сортов. Уникальные аллели встречались у 7,1 % сортов выборки (Алмаз, Брянский деликатес, Вдохновение, Живица, Нарочь, Победа). Максимальное число редких и/или уникальных аллелей на сорт не превышало

Table 2. Polymorphism in studied 14 SSR loci for subset of 113 cultivars from VIR collection (marked in bold – min and max values)

#	Locus	Chromo- some	Repeat	Number of alleles	Fragment size (min–max)	PIC	Number of rare alleles	Number of unique alleles	Expected hetero- zygosity	The frequency of SSR loci in:	
										simplex	hetero- zygote (D+T+Q)
1	STG 0016	I	(AGA) ₈	7	118–157	0.764	0	1	0.857	0.053	0.947
2	STG 0025	X	(AAAC) ₅	3	194–202	0.544	1	0	0.667	0.202	0.798
3	Sti 001	IV	(AAT) _n	7	170–194	0.751	1	1	0.857	0.099	0.901
4	Sti 012	IV	(ATT) _n	7	167–191	0.793	0	0	0.857	0.117	0.883
5	Sti 014	IX	(TGG) _n (AGG) _n	4	121–130	0.689	0	0	0.750	0.063	0.937
6	Sti 030	XII	(ATT) _n	8	85–106	0.760	2	0	0.875	0.096	0.904
7	Sti 032	V	(GGA) _n	7	108–126	0.811	1	0	0.857	0.009	0.991
8	Sti 033	VII	(AGG) _n	9	112–136	0.780	4	0	0.889	0.027	0.973
9	Sti 046	XI	(GAT) _n	10	179–206	0.837	1	0	0.900	0.000	1.000
10	STM 0037	XI	(TC) ₅ (AC) ₆ AA (AC) ₇ (AT) ₄	10	70–90	0.818	1	3	0.900	0.045	0.955
11	STM 1104	VIII	(TCT) ₅	5	166–178	0.597	1	0	0.800	0.354	0.646
12	STM 1106	X	(ATT) ₁₃	8	139–187	0.653	1	2	0.875	0.642	0.358
13	STM 5121	XII	(TGT) ₅	4	280–289	0.602	1	0	0.750	0.385	0.615
14	STM 5127	I	(TCT) _n	7	236–269	0.750	2	1	0.857	0.405	0.595
Total				96			16	8			

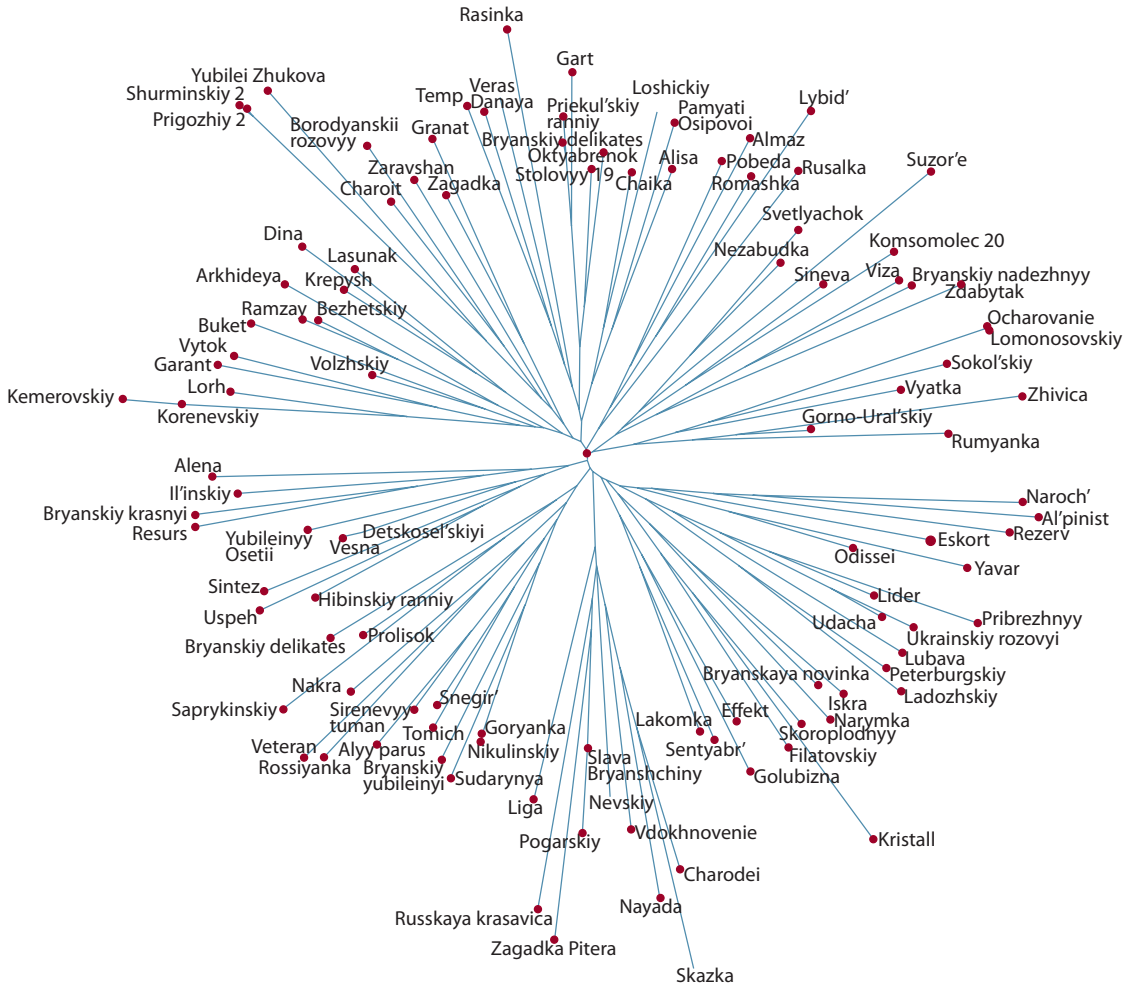


Fig. 1. Clustering of potato varieties on the basis of SSR polymorphisms in 14 loci. The WNJ method, program DARwin 5.0.158.

трех, таких сортов в выборке оказалось всего три: Алмаз (STM5127₂₄₅, STG0016₁₅₇, STM0037₇₀), Брянский деликатес (Sti032₁₁₄, Sti033₁₂₇, STM0037₉₀) и Юбилей Жукова (STM1104₁₆₆, STM5127₂₆₉, STM5121₂₈₉). Большинство сортов с редкими и уникальными аллелями являются межвидовыми гибридами.

Сопоставление полученных данных с родословными сортов и временем их создания показало, что начиная с 1950-х гг. частота сортов с редкими и уникальными аллелями SSR-локусов постоянно возрастает (рис. 2). Отметим, что именно со второй половины XX в. в селекции картофеля начала широко использоваться межвидовая гибридизация. Большинство сортов, имеющих одновременно несколько редких и уникальных аллелей, были созданы после 1980 г. на основе межвидовой гибридизации с участием нескольких диких видов.

Молекулярный скрининг

с использованием маркеров гена *H1*

Маркер 57R. Диагностический фрагмент 452 п. о. маркера 57R выявлен у 33 (30,3 %) из 109 селекционных сортов. Подавляющее большинство сортов с диагностированным фрагментом 57R₄₅₂ были устойчивыми или слабо поражались нематодой (табл. 3). Соответствие между устойчивостью и присутствием диагностического фрагмента было высоким, но не абсолютным – 93,5 % (рис. 3). Исключение составили устойчивый сорт Сузорье и полупоражаемый сорт Здабытак, у которых данный маркер обнаружен не был, и три восприимчивых сорта (Гарант, Ломоносовский, Румянка), у которых был выявлен диагностический фрагмент.

Маркер TG689. В пределах анализируемой выборки результаты скрининга с маркерами TG689 и 57R полностью совпали (см. табл. 3). По сравнению с 57R маркер TG689 демонстрировал меньшую стабильность: результаты нескольких повторностей опыта в ряде случаев различались. Следует также отметить значительную зависимость амплификации от условий реакции. В частности, применение обычных программ ПЦР приводило к появлению фрагментов 141 п. о. у многих поражаемых сортов, в том числе у отрицательного контроля – сорта Невский. В более жестких условиях, при применении функции Touchdown, полученные результаты были более стабильны. Возможность ложных позитивных результатов для маркера TG689 отмечается в литературе (Schultz et al., 2012). В связи с этим мы изучили возможность применения в молекулярном скрининге и других известных маркеров гена *H1*.

Маркер N146. Диагностический фрагмент N146₅₀₆ был выявлен у 30 сортов выборки (см. табл. 3). В основном результаты скрининга с N146 и другими маркерами гена *H1* совпадали, однако у трех устойчивых сортов (Кристалл, Ладожский, Рождественский) фрагмент N146₅₀₆ отсутствовал при наличии 57R₄₅₂ и TG689₁₄₁. Эффективность маркера N146 – наличие диагностического фрагмента у устойчивых и слабопоражаемых сортов – составила 83,9 % (см. рис. 3).

Маркер N195. Диагностический фрагмент 337 п. о. маркера N195 выявлен у 27 сортов. Эффективность маркера N195 по сравнению с 57R и TG689 в пределах изу-

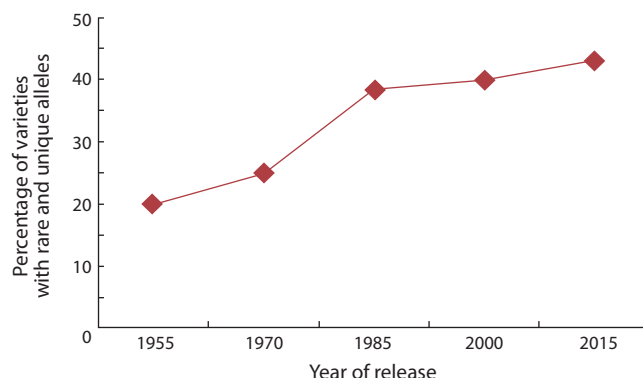


Fig. 2. The frequencies of varieties with rare and unique alleles of 14 SSR loci in different breeding stages.

чаемой выборки была несколько ниже – 74,2 % (см. табл. 3, рис. 3).

Маркер 239E4left/AluI. Данный маркер относится к категории CAPS-маркеров – детекционные фрагменты 120 и 230 п. о. возникают после рестрикции ПЦР-продуктов рестриктазой AluI. Соответственно, образование амплификационных продуктов в каждой реакции дает возможность контроля успешности протекания ПЦР независимо от генотипа и делает получаемые результаты более надежными. Диагностические фрагменты маркера 239E4left/AluI детектированы у двух нематодоустойчивых сортов – Алмаз и контрольного сорта Sante (см. рис. 3). Наряду с 239E4left/AluI у этих двух сортов также обнаружены маркеры 57R, TG689, N146, N195 (см. табл. 3).

Молекулярный скрининг с помощью маркера *Gro1-4*

В анализируемой выборке выявлено только четыре генотипа с маркером *Gro1-4*: два нематодоустойчивых сорта – Сударыня и Живица, слабопоражаемый сорт Сапрыкинский и восприимчивый сорт Погарский. Все эти четыре сорта наряду с маркером *Gro1-4* обладали и маркерами гена *H1* – 57R, TG689, N146, N195 (см. табл. 3). Известно, что один из них – сорт Погарский – был выведен в результате клонового отбора из сорта Ресурс. Однако ни данные SSR-анализа, ни данные MAS не подтверждают их близкого родства, что указывает на необходимость повторного анализа сортов Погарский и Ресурс с использованием оригинального материала.

Гаплотипы сортов. Сопоставление результатов молекулярного скрининга со всеми пятью маркерами гена *H1* и маркером гена *Gro1-4* позволило выявить у сортов шесть гаплотипов (см. табл. 3). Все пять маркеров гена *H1* имели только два устойчивых сорта – Алмаз и контрольный сорт Sante (гаплотип H1/5). Наибольшее число устойчивых и слабопоражаемых сортов (24 из 31) имеют четыре маркера гена *H1*: 57R, TG689, N146, N195 (гаплотип H1/4). Те же четыре маркера гена *H1* в сочетании с маркером *Gro1-4* выявлены у сортов Живица, Сударыня, Сапрыкинский, Погарский (гаплотип H1/4_Gro1/1). Малочисленные гаплотипы H1/3 (с маркерами 57R, TG689, N146) и H1/2 (57R, TG689) включают по три сорта каждый. У сортов наиболее многочисленного гаплотипа H1/0 не выявлено

Table 3. Prevalence of markers associated with the *H1* and *Gro1-4* genes, controlling the resistance to pathotype Ro1 of *G. rostochiensis* in potato varieties

Markers of gene <i>H1</i> (V)						<i>Gro1-4</i> - marker (VII)	Гаплотипы селекционных сортов
57R ₄₅₀	TG689 ₁₄₁	N146 ₅₀₆	N195 ₃₃₇	239E4left/ AluI ₂₃₀	Gro1-4		
+	+	+	+	+	0		Haplotype H1/5 <i>n</i> = 1 R (1): Almaz (control Sante)
+	+	+	+	0	0		Haplotype H1/4 <i>n</i> = 22 R (18): Al'pinist; Arkhideya; Bezhitskiy; Veras; Vladikavkazskiy; Vdokhnovenie; Granat; Danaya; Krepysh; Liga; Nayada; Ocharovanie; Prigozhiy 2; Prolisok; Rasinka; Rossiyanika; Rusalka, Shurminskiy 2 R/S (2): Alyy parus; Zagadka S (2): Lomonosovskiy; Rummyanka
					+		Haplotype H1/4_Gro1/1 <i>n</i> = 4 R (2): Zhivica; Sudarynya R/S (1): Saprykinskiy S (1): Pogarskiy (control – <i>i</i> -144844 clone of <i>S. gurlai</i> accession k-12403)
+	+	+	0	0	0		Haplotype H1/3 <i>n</i> = 3 R (2): Dina; Naroch' S (1): Garant
+	+	0	0	0	0		Haplotype H1/2 <i>n</i> = 3 R (3): Kristall; Ladozhskiy; Rozhdestvenskiy
0	0	0	0	0	0		Haplotype H1/0 <i>n</i> = 76 R (1): Suzor'e R/S (1): Zdabytak S (73): Alena; Alisa; Borodyanskiy rozovyy; Bryanskiy nadezhnyy; Bryanskaya novinka; Bryanskiy krasnyi; Bryanskiy yubileinyi; Buket; Vesna; Veteran; Viza; Volzhskiy; Vytok; Vyatka; Gart; Golubizna; Goryanka; Detskosel'skiyi; Zagadka Pitera; Zaravshan; Iskra; Il'inskiy; Kemerovskiy; Komsomolec 20; Lakomka; Lasunak; Lider; Lorh; Loshickiy; Lybid'; Lubava; Nakra; Narymka; Nevskiy; Nezabudka; Nikulinskiy; Odissei; Oktyabrenok; Pamyati Osipovoi; Peterburgskiy; Pobeda; Pribrezhnyy; Priekul'skiy ranniy; Ramzay; Rezerv; Resurs; Romashka; Russkaya krasavica; Svetlyachok; Sentyabr'; Sineva; Sintez; Sirenevyy tuman; Skazka; Skoroplodnyy; Snegir'; Sokol'skiy; Temp; Tomich; Udacha; Ukrainskiy rozovyy; Uspeh; Falenskiy; Filatovskiy; Hibinskiy ranniy; Chaika; Charodei; Charoit; Ekskort, Effekt; Yubilei Zhukova; Yubileiny Osetii; Yavar Missing data (1): Korenevskiy

R, resistant to PCN; R/S, moderately resistant; S, susceptible

ни одного маркера генов устойчивости. Отметим, что из 76 сортов, имеющих гаплотип H1/0, восприимчивыми являются 96,1 % (см. табл. 3). Таким образом, отсутствие у тестируемого сорта всех четырех маркеров (57R, TG689, N146, N195) гена *H1* и маркера *Gro1-4* позволяет достаточно уверенно прогнозировать его восприимчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*.

Полученные нами результаты указывают на различную эффективность использованных маркеров генов *H1* и *Gro1-4* при проведении молекулярного скрининга

у селекционных сортов (см. рис. 3), что согласуется и с литературными данными (Milczarek et al., 2011; Schultz et al., 2012).

Различия в эффективности использования маркеров генов *Gro1-4* и *H1* могут быть связаны с генетическим разнообразием доноров нематодоустойчивости, участвовавших в родословных селекционных сортов. Действительно, при изучении перекрестноопыляемых диплоидных культурных и диких видов картофеля в сопряженном молекулярном и фитопатологическом скрининге (Limantseva et

al., 2014) мы не смогли выявить какую-либо ассоциацию между нематодоустойчивостью и наличием маркеров гена *H1* (239E4left/AluI и TG689). В этой работе были выделены устойчивые клоны, как имеющие молекулярные маркеры, так и без них. Очевидно, что среди родительских форм исследованных нами отечественных сортов генотипы с маркерами 239E4left/AluI и Gro1-4 гена *H1* встречались крайне редко (см. рис. 3). В то же время скрининг 72 зарубежных сортов (Milczarek et al., 2011) выявил гораздо большую частоту встречаемости этих маркеров (239E4left/AluI – 23,6 % и Gro1-4 – 19,4 %), а также другие варианты гаплотипов, которые не встречались в проанализированной нами выборке.

С учетом разнообразия гаплотипного состава селекционных сортов, а также источников устойчивости к ЗКН для повышения надежности молекулярного скрининга можно рекомендовать одновременное использование нескольких маркеров локуса *H1*.

Выявленное разнообразие гаплотипного состава селекционных сортов может быть связано с рекомбинационными событиями. Известно, что маркеры 239E4left и 57R на интегрированной карте локуса *H1* располагаются на существенном расстоянии друг от друга (Finkers-Tomczak et al., 2011). 239E4left расположен на расстоянии 2,1 см вверх по течению от ассоциированного с устойчивостью сегмента '341 Kb', в котором локализованы копии *RGL* последовательностей типа NB-LRR, а маркер 57R интегрирован в район '341 Kb'. Установить взаимное расположение других маркеров гена *H1* затруднительно, поскольку их картирование проводилось разными авторами на различном генетическом материале.

Не исключена также возможность, что у определенных сортов различные маркеры гена *H1* локализируются на разных гомологах хромосомы V, формируя определенный гаплотип, который фиксируется вегетативным типом размножения сортов картофеля. Например, такая ситуация вероятна для сорта Живица (57R/TG689/N146/N195) – его родительской формой является сорт Ponto, у которого маркер 57R отсутствует (Milczarek et al., 2011).

Согласно литературным данным, ген *H1* интрогрессирован в сорта от единичных нематодоустойчивых образцов *S. andigenum*, *S. vernei* (Ellenby, 1954; Roos, 1979) и *S. chacoense* (Каталог..., 2007), а ген *Gro1-4* – от образцов *S. spagazzinii* (Roos, 1979; Barone et al., 1990). Анализ родословных показывает, что *S. vernei* и *S. andigenum* участвовали в выведении сортов с гаплотипами H1/5, H1/4_Gro1-4, H1/4. Один и тот же гаплотип могут иметь разные по происхождению нематодоустойчивые сорта, например гаплотип H1/4 имеют сорта, производные от немецкого сорта Нудра (Бежицкий, Владикавказский, Загадка, Пролисок, Расинка), созданного с участием нематодоустойчивых образцов *S. andigenum* и *S. vernei*, и сорта (Очарование, Вдохновение и др.), выведенные на основе многовидовых гибридов с участием *S. demissum*, *S. phureja*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum*, *S. vernei* (Гаджиев, Лебедева, 2010).

Ген *H1* обеспечивает эффективную защиту сортов картофеля против патотипа Ro1 *G. rostochiensis* уже более 50 лет, с тех пор когда в начале 1950-х гг. были созданы первые зарубежные нематодоустойчивые сорта (Brad-

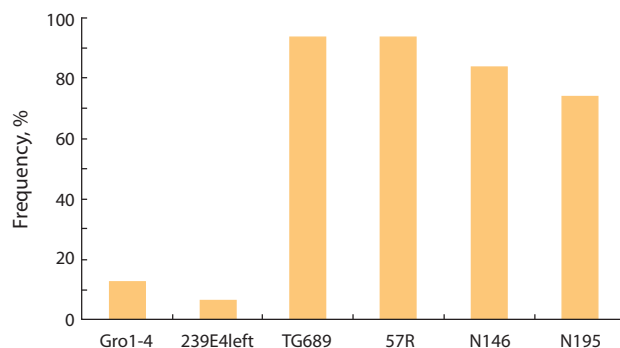


Fig. 3. The frequencies of the markers of genes *H1* and *Gro1-4* in *G. rostochiensis* varieties resistant and moderately resistant to pathotype Ro1 (n = 31).

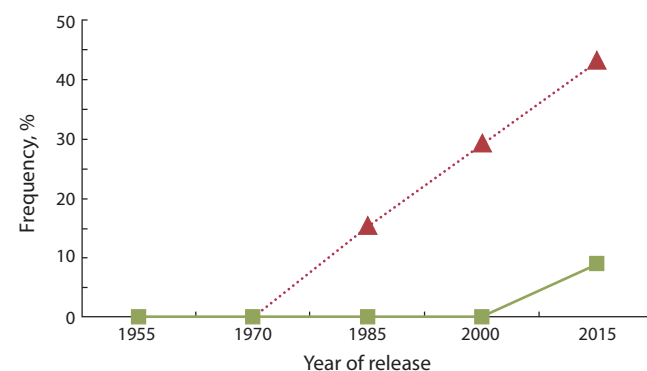


Fig. 4. Variation in the proportions of varieties with markers *H1* gene (dashed line) and *Gro1-4* gene (solid line) depending on the year of their release.

shaw et al., 2006). В России сорта с устойчивостью к патотипу Ro1 ЗКН появились позднее – в конце 1960-х гг. В связи с актуальностью создания отечественных нематодоустойчивых сортов данное направление селекции активно развивается в Российской Федерации и странах ближнего зарубежья. Отражением этого процесса может служить зависимость частоты встречаемости маркеров генов *H1* и *Gro1-4* у отечественных сортов от времени их создания (рис. 4).

Сорта анализируемой выборки, выведенные до начала 1970-х гг., не имели маркеров этих генов и относились к группе восприимчивых. К концу 1990-х гг. частота сортов с маркерами генов *H1* и *Gro1-4* резко возросла, достигнув максимальных значений среди современных сортов. Выявленная тенденция согласуется с динамикой накопления редких и уникальных аллелей SSR-локусов (см. рис. 1). Более того, многие сорта с уникальными и редкими аллелями SSR-локусов имели и маркеры генов *H1* и *Gro1-4* (например, Алмаз – гаплотип H1/5; Вдохновение – H1/4; Нарочь – H1/3; Живица – H1/4_Gro1/1). Очевидным объяснением выявленных тенденций служит межвидовая гибридизация – основная причина расширения генетического разнообразия современных селекционных сортов.

Молекулярный скрининг сортов с использованием маркеров NL25 и Sti 046, сцепленных с геном *Sen1*

Селекция отечественных сортов на устойчивость к *S. endobioticum* была начата в конце 1920-х гг., а в настоящее время практически все сорта устойчивы к возбудителю рака картофеля (патотип 1), поскольку признак ракоустойчивости обязателен для вновь создаваемых сортов в Российской Федерации.

Маркер NL25¹⁴⁰⁰. Согласно литературным данным (Gebhardt et al., 2006), при использовании маркера NL25 у устойчивых форм детектированы два компонента – 1200 п.о. и 1400 п.о. – последний является диагностическим фрагментом доминантного аллеля гена *Sen1*. С использованием праймера NL25 проанализировано 98 сортов. Результаты молекулярного скрининга были сопоставлены с литературными данными по оценке ракоустойчивости. У 95 исследованных ракоустойчивых сортов выявлен диагностический компонент 1400 п.о. У трех изученных восприимчивых сортов – Лорх (1931), Кореневский (1931), Волжский (1961) – обнаружен только один амплификационный продукт, имеющий размер около 1200 п.о. Эффективность использования маркера NL25 для скрининга на устойчивость к *S. endobioticum* (патотип 1) отмечена и в других работах (Кузьмина и др., 2015).

Маркер Sti046. Относительно недавно был предложен ряд других маркеров гена *Sen1*, в том числе микросателлитный маркер Sti046₂₂₃, который должен присутствовать у поражаемых форм и отсутствовать у устойчивых (Ballvora et al., 2011). Лocus Sti046 участвовал в SSR-анализе, мы изучили возможность его использования и в скрининге на устойчивость к *S. endobioticum*. В данном локусе у сортов выборки было выявлено 10 SSR-аллелей – фрагменты размерами от 179 до 206 п.о., т.е. аллель Sti046₂₂₃ обнаружен не был, не удалось также установить корреляции между восприимчивостью сортов к *S. endobioticum* и наличием любого другого аллеля данного локуса. Предлагаемый А. Ballvora с коллегами (2011) маркер, видимо, эффективен только для расщепляющихся популяций, изученных этими авторами.

Поскольку фенотипирование признаков рако- и нематоустойчивости очень трудоемко и дорого, маркеры генов *H1*, *Gro1-4* и *Sen1* широко применяются в зарубежных селекционно-генетических программах (Gebhardt et al., 2006; Milczarek et al., 2011; Schultz et al., 2012; Asano, Tamiya, 2016) и начинают активно использоваться российскими исследователями (Бирюкова и др., 2008, 2015; Шанина и др., 2011; Кузьмина и др., 2015). Маркеры N146 и N195 еще не участвовали в скрининге отечественных сортов, недавно появились первые данные о наличии маркера 57R у единичных русских сортов (Загадка, Крепыш, Россиянка) (Бирюкова и др., 2015), в то время как маркеры TG689 и Gro1-4 активно используются в отечественных селекционных программах, что предоставляет возможность для сопоставления результатов. Так, для 16 сортов (Архидея, Ветеран, Детскоельский, Дина, Живица, Ильинский, Лакомка, Накра, Нарочь, Наяда, Победа, Росинка, Снегирь, Сокольский, Удача и Шурминский-2) данные скрининга с TG689 в нашей работе совпали с результатами В.П. Бирюковой с коллегами (2008, 2015).

Разночтения касаются одного сорта, Бежицкий, у которого мы выявили фрагмент TG689₁₄₁, в то время как в других работах (Бирюкова и др., 2008; Шанина и др., 2011) у сорта Бежицкий он не обнаруживался, что может быть связано с плохой амплификацией, а также с проблемами идентичности сортообразцов в разных коллекциях.

В работе О.Ю. Кузьминой с коллегами (2015) выявлено наличие маркеров Gro1-4 у сорта Живица и TG689₁₄₁ – у сортов Крепыш и Живица и отсутствие обоих маркеров у сортов Одиссей, Сказка, Сокольский и Чародей, что соответствует нашим данным. Для сортов Ломоносовский и Чароит результаты не совпали. В данном случае мы запросили материал у оригинаторов и после повторного анализа подтвердили полученные нами данные (см. табл. 3). Отметим, что совместное использование SSR- и MAS-маркеров предоставляет возможность для перепроверки результатов, выявления дублетов и ошибок в поддержании коллекционных образцов.

Результаты настоящего исследования позволили выделить сорта, наиболее перспективные для включения в дальнейший селекционный процесс, обладающие комплексом маркеров генов устойчивости *H1*, *Gro1-4* и *Sen1* (например, Сударыня, Живица). Кроме того, у этих же сортов выявлены маркеры генов, детерминирующих крайнюю устойчивость к вирусу Y картофеля – у сорта Живица – маркер RYSC3 гена *Ry^{adg}*, а у сорта Сударыня – маркеры YES3-3A и GP122-406/ EcoRV гена *Ry^{sto}* (Готовится к публикации).

В Российской Федерации такие сорта создаются благодаря таланту селекционеров, использующих традиционные методы межсортовой и межвидовой гибридизации в сочетании с отбором перспективных форм по фенотипу, что требует много времени, сил и материальных затрат. Использование методов маркер-ориентированной и геномной селекции позволит повысить эффективность отечественных программ по пирамидированию генов (QTL), ассоциированных с хозяйственно ценными признаками, и сократить время создания сортов нового поколения.

Acknowledgments

This work is supported by the Russian Federation Integrated Targeted Program «Academic support of the activities in the development of the domestic seed fund and crop protection products in order to ensure the production of competitive farm products by Russian manufacturers, 2016–2025», priority «Potato industry», and by the Program of Basic Research in State Academies of Sciences, 2013–2020.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Asano K., Tamiya S. Breeding of pest and disease resistant potato cultivars in Japan by using classical and molecular approaches. JARQ. 2016;50(1):1-6.
- Baayen R.P., Cochius G., Hendriks H., Meffert J.P., Bakker J., Bekker M., van den Boogert P.H., Stachewicz H., van Leeuwen G.C.M. History of potato wart disease in Europe – a proposal for harmonization in defining pathotypes. Eur. J. Plant Pathol. 2006;116:21-31. DOI 10.1007/s10658-006-9039-y.
- Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van

- Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Bakker J., Govere A. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(1):146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.
- Ballvora A., Flath K., Lubeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.-R., Gebhardt C. Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes 1, 2, 6 and 18. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:1281-1292.
- Ballvora A., Hesselbach J., Niewohner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 1995;249:82-90.
- Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F., Gebhardt C. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 1990;224(2):177-182.
- Biryukova V.A., Shmyglya I.V., Abrosimova S.B., Zapekina T.I., Melleshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V. SMolecular marker-assisted search for donors of genes for resistance to pathogens among accessions raised at the Lorkh Institute of Potato Farming and genetic collections. *Zashhita kartofelya = Potato Protection.* 2015;1:3-7. (in Russian)
- Biryukova V.A., Zhuravlev A.A., Abrosimova S.B., Kostina L.I., Khromova L.M., Shmyglya I.V., Morozova N.N., Kirsanova S.N. The use of molecular markers of the *H1* and *Gro1* genes for resistance to golden potato cyst nematode. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences* 2008;34(6):3-6. (in Russian)
- Bornet B., Goraguer F., Joly G., Branchard M. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome.* 2002;45(3):481-484.
- Bradshaw J.E., Bryan G.J., Ramsay G. Genetic recourses (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Res.* 2006;49:49-65. DOI 10.1007/s11540-006-9002-5.
- Braun A., Wenzel G. Molecular analysis of genetic variation in potato (*Solanum tuberosum* L.). I. German cultivars and advanced clones. *Potato Res.* 2004;47(5):81-92. DOI 10.1007/BF02731971.
- Bukasov S.M., Kameraz A.Y. Osnovy selektsii kartofelya [Fundamentals of Potato Breeding]. Moscow, Leningrad, Selhooziz Publ., 1959. (in Russian)
- Côté M.-J., Leduc L., Reid A. Evaluation of simple sequence repeat (SSR) markers established in Europe as a method for the identification of potato varieties grown in Canada. *Am. J. Potato Res.* 2013;90:340-350. DOI 10.1007/s12230-013-9310-7.
- Dice L. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* 1945;26:297-302.
- Ellenby C. Tuber forming species and varieties of the genus *Solanum* tested for resistance to the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Euphytica.* 1954;3:195-202. DOI 10.1007/BF00055593.
- Feingold S., Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:456-466. DOI 10.1007/s00122-005-2028-2.
- Finkers-Tomczak A., Bakker E., Boer J., Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Govere A. Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus *H1* reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.). *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:595-608. DOI 10.1007/s00122-010-1472-9.
- Fu Y., Peterson G., Richards K., Tarn T., Percy J. Genetic diversity of Canadian and exotic potato germplasm revealed by simple sequence repeat markers. *Am. J. Potato Res.* 2009. 86(1):38-48. DOI 10.1007/s12230-008-9059-6.
- Gadzhiev N.M., Lebedeva V.A. The origin of some Belogorka potato varieties. *Kartofel i ovoshhi = Potato and vegetables.* 2010;8:21-22. (in Russian)
- Gajewskiy N.A. Znakomstvo s evolyutsionnoy genetikoy [Introduction to evolutionary genetics]. Krasnoyarsk, 2002. (in Russian)
- Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National cultivated potato collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2010;57:1151-1164. DOI 10.1007/s10722-010-9554-8.
- 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;60:1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.
- Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Trends in Genetics.* 2013;29 (4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.
- Gebhardt C., Bellin A., Henselewski A., Lehmann W., Schwarzfischer A., Valkonen J. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112:1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.
- GCDT (The Global Crop Diversity Trust) Background on the development of "Global Strategy for the *Ex situ* Conservation of Potato". 2006. Available at: <https://www.croptrust.org/wp-content/uploads/2014/2/Potato-Strategy-FINAL-30Jan07.pdf>
- Ghislain M., Nunez J., Herera M. del R., Rignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol. Breeding.* 2009;23:377-388. DOI 10.1007/s11032-008-9240-0.
- Gorji A.M., Pocai P., Polgar Z., Taller J. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCOT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *Am. J. Pot. Res.* 2011;88:226-237. DOI 10.1007/s12230-011-9187-2.
- Hehl R., Faurie E., Hesselbach J., Salamini F., Witham S. TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:379-386. DOI 10.1007/s001220051083.
- Hirsch C.D., Hamilton J.P., Childs K.L., Cepela J., Crisovan E., Vailancourt B., Hirsch C.N. A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding. *Plant Genome.* 2014;7:1-12. DOI 10.3835/plantgenome2013.12.0042.
- Kawchuk I.M., Lynch D.R., Thomas J., Penner B., Silito D., Kulcsar F. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Amer. Potato J.* 1996;73:325-335. DOI 10.1007/BF02849164.
- Khiutti A., Afanasenko O., Antonova O., Shuvalov O., Novikova L., Krylova E., Chalaya N., Mironenko N., Spooner D.M., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Synchytrium endobioticum* in cultivated potato accessions from the collection of Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) collection. *Plant Breeding.* 2012;131:744-750. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.02005.x.
- Kort J., Ross H., Rumpfenhorst H.J., Stone A.R. An international scheme for the identification of pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica.* 1977;23:333-339.
- Kuzminova O.A., Staszewski Z., Vologin S.G., Gimaeva E.A. Molecular-genetic analysis of potato breeding material for the presence of genes for resistance to *Globodera rostochiensis*. *Materialy Vserossiyskoy zaochnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh, posvyashchennoy pamyati R.G. Gareeva "Sovremennyye tekhnologii vyrashchivaniya selskokhozyaystvennykh kultur"*. [Proceedings of the scientific-practical teleconference of young scientists dedicated to the memory of R.G. Gareev "Modern technologies of growing crops"]. Kazan, 2015;88-97. (in Russian)
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in

- cultivated and wild potato species accessions. *Plant Breeding* (Wiley). 2014;133(5):660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- Loeschcke V., Stegemann H. The application of PAG electrophoresis for studying of the potato proteins. *Z. Naturforschung*. 1966;21:879-888.
- McGregor C., Lambert C., Greyling M., Louw H., Warnich L. A comparative assessment of fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*. 2000;113:135-144.
- Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J. Potato Res.* 2011;88:245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.
- Moisan-Thiery M., Marhadour S., Kerlan M., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T., LeHingrat Y. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Res.* 2005;48:191-200. DOI 10.1007/BF02742376.
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *PNAS USA*. 1973;70:3321-3323.
- Paal J., Henselewski H., Muth J., Meksem K., Menendez C., Salamini F., Ballvora A., Gebhardt C. Molecular cloning of the potato *Gro 1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J.* 2004;38:285-297.
- Provan J., Powell W., Waugh R. Analysis of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) using intermicrosatellite amplification. *Genome*. 1996;39:767-769.
- Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., Blas Sevillano R.H., Riseman A. Review of potato molecular markers to enhance trait selection. *Am. J. Potato Res.* 2015;92(4):455-472. DOI 10.1007/s12230-015-9455-7.
- Ross H. Potato breeding – problems and perspectives. *J. Plant Breed.* 1986; Suppl. 13. Berlin; Hamburg: Parey, 1986.
- Ryzhova N.N., Martirosyan E.V., Kochieva E.Z. Analysis of SSR polymorphisms in potato (*Solanum tuberosum*) varieties bred in Russia. *Genetika = Genetics*(Moscow). 2010;46(4):481-487. (in Russian)
- Salaman R.N. Potato varieties. Cambridge Univ. Press, 1926.
- Schultz L., Cogan N.O.I., Mclean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.N.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato. *Plant Breeding*. 2012;131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.
- Shanina E.P., Klyukina E.M., Koksharov V.P., Shanin A.A. Development of nematode-resistant varieties is the priority in potato breeding in the middle Ural. *Agrarnyy vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2011;2(81):59-61. (in Russian)
- Simakov E.A., Yakovleva V.A., Abrosimova S.B., Dyachenko A.A., Biryukova V.A. How to evaluate potato resistance to *Globodera rostochiensis*? *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2009;1:28-29. (in Russian)
- Spooner D.M., Nunez J., Trujillo G., del Rosario Herrera M., Guzman F., Ghislain M. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *PNAS USA*. 2007;104:19398-19403. DOI 10.1073/pnas.0709796104.
- Stuart W. The potato: Its culture, uses, history and classification. Ed. W. Stuart. J.B. Lippincott, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1937.
- Takeuchi T., Sasaki J., Suzuki T., Horita H., Hiura S., Iketani S., Fujita R., Senda K. DNA markers for efficient selection of disease and pests resistance genes in potato (in Japanese). *Hokkaido Nogyo-Shiken-Kaigi-Shiryo* 2008. 2009;1-26.
- Uitdewilligen J.G., Wolters A.-M.A., D'hoop B.B., Borm T.J.A., Visser R.G.F., Eck H.J. A Next-generation sequencing method for genotyping-by-sequencing of highly heterozygous autotetraploid potato. *PLoS ONE*. 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0062355.
- Van Berloo R., Hutten R., van Eck H., Visser R.G.F. An online potato pedigree database resource. *Potato Res.* 2007;50:45-57. DOI 10.1007/s11540-007-9028-3.
- Vos P.G., Uitdewilligen J., Visser R.G.F., Eck H.J. Development and analysis of a 20K SNP array for potato: an insight into the breeding history. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128:2387-2401. DOI 10.1007/s00122-015-2593-y.
- Yashina I.M., Kukushkina L.N., Derevyagina M.K., Babaytseva O.V. i dr. Catalogue of new donors of field potato resistance to late blight. *Katalog. Rossiyskaya akademiya selskokhozyaystvennykh nauk VNIKKh* [Catalogue. Lorkh Institute of Potato Farming, Russian Academy of Agricultural Sciences]. Moscow, 2007. (in Russian)
- Zaitseva N.D. *Rukovodstvo po opredeleniyu sortov kartofelya* [Guidelines for identification of potato varieties.] Moscow, 1965. (in Russian)



Комплексная оценка исходного материала яблони для селекции на иммунитет и качество плодов

Е.В. Ульяновская , Т.Г. Причко, Л.Д. Чалая

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства», Краснодар, Россия

Представлены результаты многолетнего изучения новых перспективных и районированных сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.), произрастающих в условиях юга России. Оценка сортов яблони проводили по устойчивости к основным грибным патогенам: парше (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) и мучнистой росе (*Podosphaera leucotricha* Salm.), качеству и товарности плодов, содержанию биологически активных веществ, формирующих антиоксидантные свойства плодов. В селекции яблони применен усовершенствованный метод полиплоидии, основанный на вовлечении в селекционный процесс иммунных к парше родительских форм. В результате комплексной оценки основных агробиологических признаков сортов и форм яблони разной плоидности в нестабильных условиях окружающей среды выделены доноры и источники значимых признаков яблони для селекционного использования: устойчивости и иммунитета к основным грибным патогенам, крупноплодности, ярко-красной окраски плодов, улучшенного химического состава. Выделены высококачественные сорта яблони селекции Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства совместно с Всероссийским НИИ селекции плодовых культур, сочетающие иммунитет к парше (ген Vf) с высокой устойчивостью к мучнистой росе: Фортуна, Амулет, Кармен, Ника, Марго, Орфей, Союз и др. Выявлены иммунные к парше сорта яблони с высокой жизнеспособностью пыльцы (83–98 %): Азимут, Василиса, Кармен, Любава, Марго, Фортуна, Либерти, Прима, Флорина, Фридом. Выделены перспективные родительские формы, передающие большей части гибридного потомства хорошие вкусовые качества плодов, полиплоидные сорта: Голден Делишес тетраплоидный, Уэлси тетраплоидный, Боскопская красавица, Балсгард 0247 Е, Папировка тетраплоидная, а также диплоидные сорта: Алкмене, Прима, Редфри и Кубань. Выявлены сорта яблони с высокими химическими показателями, в том числе по содержанию сахаров – Орфей (10,8 %), Чемпион (10,5 %); витамина С – Василиса и Союз (более 9,0 мг/100 г), гибридная форма 44-24-49-у (более 11,4 мг/100 г), а также Р-активных веществ – Василиса, Любава, Марго (более 110,0 мг/100 г), использование которых в селекционных программах способствует ускоренному созданию новых генотипов с улучшенным биохимическим составом плодов.

Ключевые слова: яблоня; плоды; полиплоидия; сорт; донор; источник; товарные качества; химический состав.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ульяновская Е.В., Причко Т.Г., Чалая Л.Д. Комплексная оценка исходного материала яблони для селекции на иммунитет и качество плодов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):607-615. DOI 10.18699/VJ16.182

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ulyanovskaya E.V., Prichko T.G., Chalaya L.D. A comprehensive assessment of source material for apple breeding for immunity and fruit quality. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):607-615. DOI 10.18699/VJ16.182

ORIGINAL ARTICLE

Received 25.12.2015

Accepted for publication 13.02.2016

© AUTHORS, 2016

A comprehensive assessment of source material for apple breeding for immunity and fruit quality

E.V. Ulyanovskaya , T.G. Prichko, L.D. Chalaya

Federal State Scientific Institution North-Caucasus Zonal Scientific-Research Institute of Horticulture and Viticulture, Krasnodar, Russia

The results of years of studying new and promising varieties of Apple trees (*Malus domestica* Borkh) grown in Southern Russia. Evaluation of Apple cultivars was carried out for resistance to the major fungal pathogens scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) and powdery mildew (*Podosphaera leucotricha* Salm.), the quality and marketability of fruits, the content of biologically active substances underlying the antioxidant properties of fruits. An advanced method of polyploidy based on inclusion of parental forms with immunity to scab was applied in Apple selection. Integrated assessment of key biological traits of varieties and forms of Apple with diverse ploidy in unstable environments resulted in a selection of donors and sources of significant characteristics for Apple breeding such as resistance and immunity to major fungal pathogens, large fruit, bright red color of the fruit, improved chemical composition. High-quality varieties of Apple breeding in SKZNIISiV together with VNIISPK combining immunity to scab (the Vf gene) with high resistance to powdery mildew were selected: Fortune, Amulet, Carmen, Nika, Margo, Orfei, Souyz and others. Apple-tree grades, immune to scab, with a high viability of pollen (83–98%) were revealed: Azimuth, Vasilisa, Carmen, Lubava, Margo, Fortune, Liberty, Prima, Florina, Freedom. The promising parental forms passing to most of their hybrid progeny good tastes of fruits are Golden Delicious tetraploid, Wealthy tetraploid, Belle de Boskoop, Balsgard 0247 E, Papirovka tetraploid, and diploidy grades to Alkmene, Prima, Redfree and Kuban. Apple cultivars were revealed with high chemical indicators including the content of sugars: Orfei (10.8 %), Champion (10.5 %); vitamin C: Vasilisa and Souyz (more than 9.0 mg/100 g), hybrid form 44-24-49-uy (more than 11.4 mg/100 g); and P-active substances – Vasilisa, Lubava, Margo (more than 110.0 mg/100 g), whose use in breeding programs encourages the rapid creation of new genotypes with improved biochemical composition of fruits.

Key words: apple; fruit; polyploidy; class; donor; source; product quality; chemical composition.

Создание высококачественных сортов плодовых культур, иммунных к грибным патогенам, является приоритетным селекционным направлением, отвечающим задачам биологизации и экологизации производства плодовой продукции и охраны окружающей среды (Blazek, Paprstein, 1994; Kellerhals, Meyer, 1994; Fischer, Richter, 1999; Савельев, 2002; Козловская, 2003; Gessler et al., 2006; Седов и др., 2009; Программа..., 2013). Тенденция ослабления устойчивости к болезням у многих сортов нередко приводит к уменьшению устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам (засухе и морозам) и значительному снижению продуктивности и качества плодов (Гудковский и др., 2005; Причко, Чалай, 2011). Наблюдается и существенное сокращение чувствительности грибных патогенов к препаратам, применяемым для профилактики возникновения заболевания (Якуба, 2013). В Краснодарском крае за 2001–2015 гг. исследований отмечено 12 эпифитотий парши – наиболее распространенного и опасного заболевания яблони (возбудитель инфекции – гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter).

Исследователями различных стран выделены некоторые сорта яблони, обладающие полевой устойчивостью к местным расам парши (Bagga, Bonne, 1968; Brown, 2003). Наиболее широко в селекционных программах в мире и в России используются сорта с олиогенным типом устойчивости к парше, контролируемым геном *Vf* (Программа и методика..., 1995; Программа..., 2013; Fischer, Richter, 1999; Савельев, 2002; Козловская, 2003; Седов, 2011). В их числе сорт французской селекции Флорина, отличающийся сочетанием высокого качества плодов и иммунитета к парше. Одни из лучших показателей по качеству плодов среди иммунных к парше сортов способствовали введению сорта Флорина в районированный сортимент и его широкому распространению в садоводческих хозяйствах юга России. Как показывает мировая практика, выращивание таких сортов является экологически безопасным, наименее ресурсозатратным, и полученные плоды обладают ценными пищевыми качествами (Седов и др., 2007, 2009). Немаловажная роль при реализации селекционных программ отводится обоснованному выбору методов селекции. Практические результаты в селекции яблони к парше достигнуты при использовании доноров моногенной устойчивости, таких как *Malus floribunda* 821 (ген *Vf*), *M. pumila* R 12740-7A (ген *Vr*), *M. atrosanguinea* 804 (гены *Vf*, *Vm*), *M. prunifolia* 19651 (ген *Vf*). Для превентивной селекции на иммунитет к парше осуществляется программа создания сортов с дигенной (более длительной в отличие от моногенной) устойчивостью яблони (*Vf* + *Vr*, *Vf* + *Vm*, *Vr* + *Vm*) (Седов и др., 2009). В селекционных программах США, Канады, европейских стран активно используется ген *Vf* устойчивости к парше от клона *M. floribunda* 821 (Bagga, Bonne, 1968; Dayton, 1979; Baker, 1981; Brown et al., 2003). С 2009 г. приняты новые международные названия, в частности ген *Vf* обозначается как *Rvi6*. Перспективным в селекции на иммунитет к парше является усовершенствованный метод полиплоидии, позволяющий получать сорта яблони с высокими показателями адаптивности и качества плодов (Ненько и др., 2013; Ульяновская, 2014).

В настоящее время одна из основных нерешенных задач – совмещение в генотипе хозяйственно значимых признаков: высокая устойчивость к биотическим стрессорам среды, отличное качество плодов, влияющее на коммерческие характеристики и вкусовые достоинства (Причко, Чалай, 2011; Причко и др., 2013; Ульяновская, Супрун, 2013). Это определило целесообразность нашей работы по созданию и оценке новых сортов яблони разного уровня плоидности, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков. Основная цель исследования – выделение доноров и источников хозяйственно ценных признаков яблони для дальнейшего использования в селекционных программах и ускоренного создания иммунных сортов яблони с высокими показателями адаптивности, товарных качеств и химического состава.

Материалы и методы

Объекты исследования – генотипы яблони (*Malus domestica* Borkh.), созданные на основе видов, сортов, клонов и гибридных форм разного уровня плоидности. Исследования проводили в Опытном-производственном хозяйстве «Центральное» г. Краснодара в садах яблони 1998–2012 годов посадки на подвое М 9 в лабораторных и полевых условиях. В работе использованы селекционные программы и методики оценки генотипов яблони, в том числе изучение устойчивости бутонов, цветков и завязей к заморозкам; определение устойчивости к парше и мучнистой росе; исследование регулярности плодоношения и урожайности – по «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1999); исследование устойчивости к абиотическим стрессовым факторам – по «Программе Северо-Кавказского центра по селекции плодовых, ягодных, цветочно-декоративных культур и винограда на период до 2030 года» (2013), «Методическому и аналитическому обеспечению исследований по садоводству» (2010). Жизнеспособность пыльцы определяли путем проращивания ее в растворах сахарозы (Паушева, 1980). Подсчет хромосом проводили в точках роста с помощью пропионово-лакмоидной методики, разработанной К.С. Руденко и Г.Д. Дудукал (1971) для плодовых культур. В работе использовано оборудование ЦКП (центра коллективного пользования) СКЗНИИСиВ – микроскоп Olympus BX 41.

Исследование Р-активных веществ яблок (катехинов, лейкоантоцианов, общих полифенолов) осуществляли фотометрическим методом на приборе ФЭК КФК – 3 – 01 – «ЗОМЗ» (Вигоров, 1972); определение сахаров – титрованием Фелинговой жидкостью (Фелингами I и II) и витамина С – ускоренным методом – титрованием подготовленной пробы йодистым калием, согласно «Методическим указаниям по определению химических веществ для оценки качества урожая овощных и плодовых культур» (1979). Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием пакета анализа программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

Результаты

В ходе проведенных исследований изучены биологические и цитологические особенности новых доноров значимых признаков для дальнейшего успешного привлечения их

Table 1. Scab-resistant apple genotypes collectively raised by the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture (NCRRIH&V) and the All-Russia Research Institute of Horticultural Breeding (ARRIHB)

Variety, stock accession	Origin	Ploidy	Scab resistance	Ripening term	Appearance / fruit taste (scores)
Nika	Golden Delicious tetraploid × 2034 [F2 <i>M. floribunda</i> × Golden Delicious]	$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.7 / 4.8
Margo		$2n = 2x = 34$	V_f^*	late winter	4.7 / 4.7
12/1-21-60		$2n = 2x = 34$	V_f^*	late winter	4.7 / 4.6
12/1-21-61		$2n = 3x = 51$	V_f	winter	4.6 / 4.5
12/3-21-23		$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.5 / 4.6
Azimut	Delicious × Balsgård 0247E	$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.7 / 4.8
12/1-20-1		$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.7 / 4.7
12/1-20-6		$2n = 2x = 34$	V_f	winter	4.5 / 4.7
Granatovoe	Idared × Balsgård 0247 E	$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.6 / 4.7
12/2-21-4		$2n = 3x = 51$	V_f	late autumn	4.4 / 4.6
12/3-21-27		$2n = 3x = 51$	V_f^*	autumn	4.7 / 4.7
12/1-20-59		$2n = 3x = 51$	V_f	late autumn	4.7 / 4.8–4.9
12/1-20-31		$2n = 2x = 34$	V_f^*	summer	4.5 / 4.6–4.7
12/2-21-65	Korei × Prima	$2n = 2x = 34$	V_f^*	late autumn	4.7 / 4.6
Orfey	Golden Delicious tetraploid × OR18T13 [(Wolf River × <i>M. atrosanguinea</i> 804/240-57)]	$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.8 / 4.8
12/1-21-76		$2n = 2x = 34$	V_f	late autumn	4.8 / 4.7
12/3-21-20		$2n = 2x = 34$	V_f^*	winter	4.6 / 4.5–4.6

V_f : Presence of the dominant allele of the V_f gene for scab resistance according to phytopathological tests (ARRIHB).

V_f^* : Presence of the dominant allele of the V_f gene for scab resistance according to DNA tests (Laboratory of Genetics and Microbiology, NCRRIH&V, head Dr. I.I. Suprun).

в гибридизацию. В качестве ценного исходного материала яблони на основе многолетней оценки урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам, качества плодов и устойчивости к основным грибным патогенам сортов и элитных форм яблони разной ploidy выделены продуктивные генотипы (до 28–40 т/га) с плодами высоких вкусовых достоинств, сочетающие иммунитет к парше с полевой устойчивостью к мучнистой росе: Ника, Марго, 12/1-21-60, 12/1-21-61, 12/3-21-23 (из семьи Голден Делишес тетраплоидный × 2034 [F2 *M. floribunda* × Голден Делишес]); Азимут (Делишес × Балсгард 0247 Е); Гранатовое (Айдаред × Балсгард 0247 Е); 12/1-20-31 (Старк Джон Греймс × Прима); Орфей (Голден Делишес тетраплоидный × OR18T13 [Вольф Ривер × (Вольф Ривер × *M. atrosanguinea* 804/240-57)]) и др. (табл. 1).

По многолетним данным оценки качества пыльцы диплоидных иммунных к парше генотипов яблони выявлено, что большинство из них имеет достаточно высокую жизнеспособность пыльцы. Лучшие показатели по этому признаку (83–98 %) отмечены у сортов и элитных форм отечественной селекции: Азимут, Василиса, Кармен, Любава, Марго, Фортуна, 12/1-20-6, 12/1-20-80, 12/2-21-65, а также интродуцированных сортов: Либерти, Прима, Сестра Либерти, Флорина, Фридом. При использовании усовершенствованного метода полиплоидии эти сорта перспективны в качестве отцовской формы в интервалентных скрещиваниях (по типу $4x \times 2x$) для получения более высокого выхода гибридных семян.

Для триплоидных сортов яблони характерна низкая жизнеспособность пыльцы (Седов и др., 2008). Это подтверждают и полученные нами данные. Низкая жизнеспособность пыльцы (от 11 до 29 %) отмечена у триплоидных иммунных к парше сортов и форм яблони: Союз, Ноктюрн, 12/1-20-59, 12/2-21-4, 12/2-21-34, 12/3-21-27 и др. В связи с этим эти сорта перспективно использовать в качестве материнской формы в интервалентных скрещиваниях (по типу $3x \times 2x$). Однако в связи с тем, что у триплоидов яблони высокий выход щуплых семян и низкий выход гибридных семян в целом, для получения большего количества гибридных семян необходимо значительно увеличить объем опыленных цветков по выбранным комбинациям скрещивания.

Одним из важнейших показателей товарных качеств яблони является величина плодов. Известно, что признак «величина плодов» контролируется полигенно, и достаточно часто значительная часть семян имеет плоды мельче, чем у более мелкоплодного родителя (Программа и методика..., 1995). Поэтому в селекции яблони на совмещение признаков устойчивости к грибным патогенам и качество плодов так важно использовать полиплоидные сорта яблони – источники признака «крупноплодность». Из 3213 изученных гибридов 1054 – крупноплодные, что составляет 32,8 % от общего количества. Высокий выход крупноплодных семян получен в семьях с участием полиплоидных сортов: Балсгард 0247 Е, Уэлси тетраплоидный, Папировка тетраплоидная, Боскопская красавица,

Table 2. Analysis of variance of the fruit weight character in apple genotypes of different ploidies

Variability	df	ms	F	σ^2	P_{in} , %
Between genotypes differing in ploidy	2	89452,7	35,7*	2090,2	45,5
Residual variability	122	2499,9	–	2499,9	54,5

df, number of degrees of freedom; ms, mean square; F, the actual Fisher criterion value; σ^2 , variance; P_{in} , %, contribution to the general variance;

* differences are proven at the 5 % significance level.

Пепин Рибстона, а также диплоидных родительских крупноплодных форм: Делишес, Айдаред, Алкмене, Кубань, Богатырь и Ветеран. Анализ изменчивости признака «масса плода» генотипов яблони разной ploidyности выявил, что доля влияния фактора «ploidyность» составила 45,5 % от общей изменчивости (табл. 2).

Выделены источники крупноплодности – сорта и элитные формы яблони: триплоиды ($2n = 3x$) из семьи Айдаред × Балсгард 0247 Е: Юнона, Ноктюрн, 44-27-76-в, 44-24-42-в, 44-24-49-ю, 12/1-20-59, 12/1-21-26, 12/1-21-43, 12/3-21-27, гибрид 12/1-21-80 (Старк Джон Грейс × Прима); диплоиды ($2n = 2x$): Гранатовое, 12/1-21-48 (Айдаред × Балсгард 0247 Е), Василиса и Любава (Прима × Уэлси тетраплоидный).

Гибриды с массой плодов свыше 300 г (очень крупные) получены в семьях с участием полиплоидных сортов: Уэлси тетраплоидный, Боскопская красавица, Балсгард 0247 Е, Папировка тетраплоидная и Пепин Рибстона, а также крупноплодных диплоидных родительских форм: Богатырь, Айдаред, Алкмене и Ветеран. В семье Прима × Уэлси тетраплоидный выделены тетраплоидные гибриды 6-1-24 и 6-1-28 со средней массой плодов свыше 500 г (исключительно крупные). Таким образом, на крупноплодность гибридного потомства влияет как уровень ploidyности, так и сорто-специфические особенности исходных родительских форм.

Важным показателем качества плодов являются их высокие вкусовые достоинства. Из 3213 гибридов 886 имеют плоды хорошего и отличного вкуса, что составляет 27,6 % от общего количества гибридного потомства. Выявлены родительские формы, передающие большей части гибридного потомства хорошие вкусовые качества плодов – полиплоидные сорта: Голден Делишес тетраплоидный, Уэлси тетраплоидный, Боскопская красавица, Балсгард 0247 Е, Папировка тетраплоидная, а также диплоидные сорта Алкмене, Прима, Редфри и Кубань, обладающие плодами хорошего вкуса и, кроме того, сорт Кубань имеет высокое содержание аскорбиновой кислоты.

Одно из основных направлений селекции яблони – создание сортов с хорошими товарными качествами, которые учитываются в российских и международных стандартах на яблоки культурных сортов, полученных от *Malus domestica* Borkh. (Стандарт..., 2003). При этом важным показателем иммунных к парше сортов яблони является стабильность размеров – диаметра (Д ср) и высоты плода (Н ср). По результатам исследований, в группе сортов летнего и осеннего сроков созревания как наиболее крупноплодные выделены триплоидные сорта Союз, Юнона, Ноктюрн (масса плода более 250,0 г). В группе зимних сортов все исследуемые сорта – диплои-

ды, среди которых наиболее крупноплодный сорт – Марго (табл. 3).

Диаметр плодов всех исследованных сортов яблони полностью соответствует существующему международному стандарту ЕЭК ООН FFV-50 и ГОСТ РФ (Стандарт..., 2003; ГОСТ..., 2013). Большинство исследованных сортов имеют округлую форму плодов (с индексом не менее 0,95 о. е.). В настоящее время особый интерес представляют генотипы, имеющие оригинальную продолговатую или вытянутую округло-коническую форму плодов: Орфей, Марго (индекс плода 1,11-1,14), 12/3-21-18, 12/3-21-20 (индекс плода 1,07-1,17). Согласно международным и отечественным стандартам, наиболее предпочтительна равномерная ярко-красная, ярко-зеленая или чисто-желтая окраска плода яблони (Стандарт..., 2003; ГОСТ..., 2013; Программа..., 2013). Ярко-красной равномерной окраской плодов различной интенсивности обладают иммунные к парше генотипы яблони: Фортуна, 12/3-21-28 (сильной интенсивности); Амулет, Кармен, Купава, 44-24-49-ю, 12/1-21-76 (средней интенсивности), в происхождении которых участвовали яркоокрашенные сорта Редфри и Прима. Чисто-желтая окраска плода характерна для сортов различного срока созревания: Золотое летнее (летний), Памяти Евдокимова (осенний), Ника (зимний), Марго (позднелинейный), полученных с участием сортов Голден Делишес и Голден Делишес тетраплоидный.

В настоящее время разработаны требования к новым сортам яблони, плоды которых к 2020 г. в условиях юга России должны содержать 13,0 % сахаров, 11,0–15,0 мг/100 г витамина С, 200,0 мг/100 г Р-активных веществ (Седов и др., 2007). Изучение химического состава позволило установить сортовую специфику плодов яблони по содержанию сахаров, количество которых в условиях Краснодарского края в представленных сортах не превышает 10,8 % (рис. 1). На накопление сахаров большое влияние оказывают суммы активных температур в период вегетации плодовых растений, количество которых при съеме плодов позднего срока созревания доходит до 3300 °С и выше. Выделены новый сорт яблони Орфей, содержащий более 10,8 % общего количества сахаров, и интродуцированный сорт Чемпион (10,5 %).

В полученном гибридном потомстве могут наблюдаться эффекты суммирующего действия генов. Такие результаты получены при использовании в качестве исходных форм сортов Прима и Уэлси тетраплоидный (10,0 и 9,2 % сахаров соответственно). Созданные с их участием генотипы Любава и 44-24-49-ю имеют более высокое содержание сахаров в плодах (10,3 и 10,5 % соответственно).

Выделение и использование в качестве исходных форм высоковитаминных сортов способствует получению на-

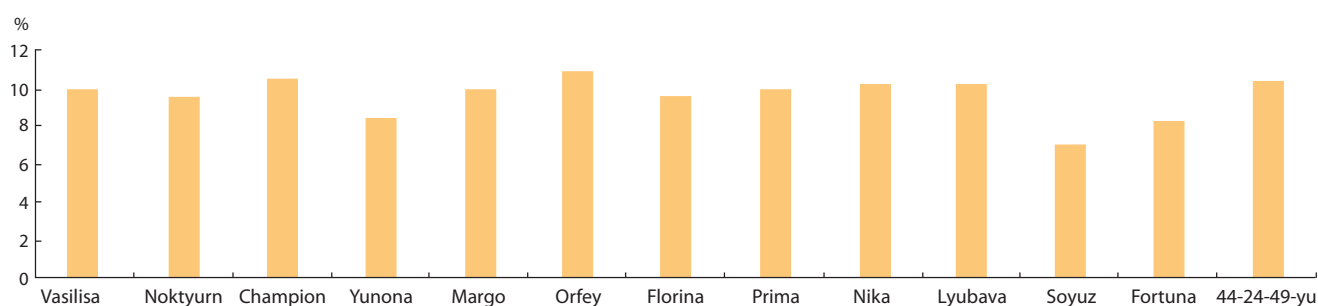
Table 3. Commercial qualities of apple fruit, 2012-2015

Variety, stock accession	Apple weight, g	Cv	Mean fruit height, mm	Mean fruit diameter, mm	Fruit index, r. u.
Summer ripening					
Soyuz*	317.0	7.32	78.6±1.0	80.0±1.3	0.98
Yunona*	256.0	18.79	64.0±1.5	77.0±2.0	0.83
44-24-49-yu*	220.0	3.42	69.6±2.0	75.6±1.3	0.92
Fortuna**	142.5	12.39	53.8±1.2	68.0±1.7	0.80
Prima (k)	198.6	18.66	66.4±2.0	68.6±1.6	0.97
Autumn ripening					
Noktyurn*	252.2	8.17	66.8±0.9	72.0±1.6	0.93
Lyubava*	221.0	6.75	70.8±0.9	82.7±1.0	0.89
Vasilisa*(k)	238.8	6.85	68.8±1.2	76.0±2.2	0.91
Winter ripening					
Nika*	212.4	7.22	68.2±0.8	69.4±1.1	0.98
Margo*	280.0	7.63	88.8±1.5	77.6±1.4	1.14
Orfey*	225.0	5.56	78.0±2.0	70.0±1.6	1.11
Florina (k)	186.0	11.42	78.0±2.2	80.0±1.6	0.98

Cv, coefficient of variance; r. u., relative units.

* Bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture in cooperation with the All-Russia Research Institute of Horticultural Breeding.

** Bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture.

**Fig. 1.** Sugar contents in apple varieties bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture.

следуемых форм и гибридов с высокими показателями витаминного состава, иногда превосходящих родительские формы. Так, исходные сорта Прима (7,9 мг/100 г) и Уэлси тетраплоидный (8,2 мг/100 г) позволили получить генотипы с более высоким содержанием аскорбиновой кислоты: Василиса (9,0 мг/100 г) и 44-24-49-ю (11,4 мг/100 г) (табл. 4).

Одним из важных показателей химического состава яблок являются катехины, обладающие высокими антиоксидантными свойствами (Van der Sluis et al., 2001). В условиях юга России среди новых сортов максимальное количество катехинов в плодах имеют Василиса, Любава, Марго, Орфей (132,2–103,0 мг/100 г), которые выгодно отличаются от родительских форм, взятых для скрещивания. Так, у сортов Прима и Уэлси тетраплоидный содержание катехинов составляет не более $88,6 \pm 14,0$ мг/100 г, а у созданных на их основе сортов Любава и Василиса – $117,0 \pm 12,6$ и $132,2 \pm 12,2$ мг/100 г соответственно.

Сортовые отличия отмечены при исследовании лейкоантоцианов – наиболее окисленных соединений фенольной природы. Совместно с катехинами и другими соединениями фенольной природы, в том числе мономерными, лейкоантоцианы формируют общий состав полифенолов, количество которых зависит от как сортовых особенностей, степени зрелости плодов, так и абиотических факторов среды. В съемной зрелости максимальным количеством общих полифенолов отличаются новые иммунные к парше сорта совместной селекции СКЗНИИСиВ и ВНИИСПК: Марго, Любава и интродуцированный сорт Флорина, которые могут быть использованы для создания сортов с высоким содержанием Р-активных веществ.

Обсуждение

На начальном этапе изучения в мире признака «устойчивость к парше» было идентифицировано шесть генов устойчивости: *Vf*, *Vm*, *Vb*, *Vbj*, *Vr*, *Va* (Dayton, Williams,

Table 4. Contents of vitamin C and P-active substances in apples, 2006-2013

Variety, stock accession	Vitamin C, mg/100 g	P-active substances, mg/100 g		
		catechins	leucoanthocyanins	total polyphenols
Vasilisa*	9.0±2.3	132.2±12.2	–	–
Noktyurn*	6.2±1.2	89.8±10.6	–	–
Champion	6.6±1.2	76.4±20.0	50.2±14.2	142.0±17.0
Yunona*	5.5±1.5	80.6±12.8	40.6±14.0	132.0±13.4
Margo*	6.0±1.2	113.0±20.0	68.8±12.9	192.0±16.5
Orfey*	5.6±0.8	103.3±13.6	73.0±10.6	180.2±12.2
Florina	8.0±1.4	96.0±8.8	58.6±6.5	188.8±7.7
Fortuna**	7.1±0.8	90.6±12.0	90.6±12.0	–
Prima	7.9±2.2	88.6±14.0	60.2±12.0	160.8±13.3
Nika*	7.8±2.0	98.0±11.8	–	–
Lyubava*	8.2±1.8	117.0±12.6	64.4±10.8	194.0±12.0
Soyuz*	9.4±0.8	97.8±10.4	–	–
44-24-49-yu*	11.4±1.0	126.0±8.8	–	–

* Bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture in cooperation with the All-Russia Research Institute of Horticultural Breeding.

** Bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture.



Fig. 2. Scab-resistant apple tree stock accessions bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture.

a, 12/1-21-61; b, 12/1-21-76; c, 12/3-21-25; d, 12/1-20-31.

1970; Седов, Жданов, 1983). В дальнейшем с использованием методов ДНК-маркирования были идентифицированы гены: *Vd* (источник гена – Durello di Forli); *Vh2*, *Vh4* (источник гена – R-12740-7A, относящийся к виду *M. pumila*); *Vh8* (источник гена – W193B, относящийся к виду *M. sylvestris*) (Gessler et al., 2006). Наиболее широко в селекционных программах в мире и в России используется ген *Vf*, на его основе создано свыше 200 иммунных к парше

сортов яблони. Однако даже наиболее перспективные из них значительно уступают по качеству, вкусу, лежкоспособности плодов лучшим образцам мирового сортимента, не обладающим необходимой степенью устойчивости к стрессорам окружающей среды, в том числе и не имеющим иммунитета к парше (Егоров и др., 2006; Седов, 2011; Программа..., 2013; Якуба, 2013). В условиях Центрально-Черноземного региона России многие интродуцированные иммунные к парше сорта яблони обладают невысоким адаптационным потенциалом, из-за недостатка тепла имеют низкие продуктивность и качество плодов (Савельева, Савельев, 2008). В Северо-Кавказском регионе России интродуцированные сорта зачастую также проявляют недостаточную адаптивность к абиотическим стрессовым факторам или их комплексу: ранним морозам осенью или в начале зимы, резким колебаниям температуры в зимние и ранневесенние месяцы, весенним возвратным заморозкам, недостатку почвенной влаги, воздушной засухе. Так, сорт Флорина, один из лучших по качеству плодов среди иммунных к парше сортов, недостаточно засухо- и морозоустойчив в условиях Западного

Предкавказья (Егоров и др., 2006). Существует проблема совмещения в одном генотипе высокой адаптивности к стрессовым факторам региона и качества плодов. По результатам многолетней оценки основных агробиологических признаков сортов и элитных форм яблони разной плоидности можно сделать вывод о положительном влиянии иммунитета к парше растений яблони на продуктивность. Кроме того, генотипы, совмещающие иммунитет к парше с повышенной засухоустойчивостью и морозоустойчивостью в условиях региона, отличаются высокой урожайностью и регулярностью плодоношения (рис. 2). Это подтверждают данные других исследователей о повышенной адаптивности новых иммунных к парше сортов к комплексу абиотических стрессовых факторов

того региона, где был создан сорт яблони (Савельева, Савельев, 2008; Седов, 2011).

Учитывая длительность, сложность и многоэтапность селекционного процесса многолетних плодовых растений, необходим научно обоснованный подбор исходного материала при составлении селекционных программ по яблоне. Генетическое разнообразие – основа ускоренного создания перспективных сортов яблони (Fischer, Richter, 1999; Keulemans, 2010; Седов и др., 2010; Седов, 2011, Еремин, 2012). По результатам многолетних исследований в Северо-Кавказском регионе России предложены генотипы различного происхождения и плоидности – доноры и источники селекционно значимых признаков яблони для ускорения селекционного процесса.

Признак	Доноры и источники селекционных признаков
Источники олигогенной устойчивости к парше (ген Vf)	Сорта селекции СКЗНИИСиб: Фортуна; селекции СКЗНИИСиб совместно с ВНИИСПК: Марго, Орфей, Гранатовое, Ника, Союз, Юнона, Рассвет, Василиса, Кармен, Талисман, Амулет, Красный янтарь; зарубежной селекции: Либерти, Прима, Флорина, Сестра Либерти, Редфри, Фридом, Голдраш; отечественной селекции: Афродита, Солнышко, Старт, Строевское, Сочи 4-5 и др.
Источники полигенной устойчивости к парше	Азимут, Фея, Талида, Золотое летнее, Арго, Палитра, Красный мак, Родничок, Богатырь, Ветеран, Орлик, Папировка тетраплоидная, Сеймо Минегата и др.
Источники олигогенной устойчивости к мучнистой росе	<i>Malus robusta</i> Rehd (ген PI_1) <i>M. zumi</i> Rehd (ген PI_2)
Донор иммунитета к парше и мучнистой росе	Арива (гены PI_2 и Vf)
Источники полигенной устойчивости к мучнистой росе	Амулет, Кармен, Талисман, Ника, Фортуна, Марго, Орфей, Союз, Юнона, Талида, Азимут, Гранатовое и др.
Источники улучшенных товарных качеств:	
массы плода	Чемпион, Любава, Юнона, Ноктюрн, Василиса, Союз, Балсгард 0247Е, Боскопская красавица, Уэлси тетраплоидный и др.
формы плода	Марго, Орфей
окраски кожицы	Фортуна, Гранатовое, Амулет, Кармен, Флорина, Айдаред, Редфри, Прима
Источники повышенного содержания:	
сахаров	Чемпион, Ренет Симиренко, Марго, Орфей, Любава, Голден Делишес, Голдраш, Флорина
аскорбиновой кислоты	Кубань, Кубанское багряное, Ренет кубанский, Прикубанское
общих полифенолов и катехинов	Марго, Любава, Флорина, Корей, Гранни Смит, Делишес, Голд спур, Вел спур и др.

Основные недостатки районированного сортимента яблони на юге России – отсутствие или недостаточное количество крупноплодных, яркоокрашенных или зеленоплодных, иммунных к парше и устойчивых к мучнистой росе сортов, с высокой адаптивностью к комплексу стрессовых абиотических факторов южного региона России (Программа..., 2013). Поэтому для селекции на комплексную устойчивость к основным грибным патогенам представляет интерес группа сортов, сочетающих иммунитет к парше и устойчивость к мучнистой росе, в том числе сорта селекции СКЗНИИСиб – Фортуна и совместной селекции СКЗНИИСиб и ВНИИСПК – Кармен, Юнона, Марго, Ника, Орфей, Союз, Амулет, Талисман, Гранатовое и Азимут.

Новый сорт может быть достаточно конкурентоспособным среди лучших возделываемых сортов, если он превосходит их по тем признакам, которые лимитируют и

обеспечивают высокое качество плодов и продуктивность (Еремин, 2004; Еремин и др., 2012; Причко и др., 2013). Усовершенствованный метод полиплоидии в селекции яблони позволил получить новые иммунные к парше зимние сорта яблони (рис. 3). Сорта адаптивны к условиям юга России, по химическим показателям и товарным качествам плодов не уступают исходным родительским формам.

Таким образом, в селекции на иммунитет к парше модификация методики возвратных скрещиваний путем использования в качестве рекуррентного родителя при каждом последующем беккроссе (от 1 до 3) полиплоидного сорта или формы ($2n = 3x = 51$; $2n = 4x = 68$) позволяет достичь оптимального сочетания иммунитета к парше, адаптивности и качества в одном генотипе. За годы исследований создано 14 иммунных к парше сортов и более 165 элитных и отборных форм яблони различных сроков



Margo (Golden Delicious tetraploid × 2034 [F2 *M. floribunda* × Golden Delishes]). Fructification type mixed. Resistant to powdery mildew, frost, and drought. Output up to 40 t/ha. Contains 13.5 % solids; 0.55 % organic acids, including 0.48 % malic acid; 0.98 % pectin.



Nika (Golden Delicious tetraploid × 2034 [F2 *M. floribunda* × Golden Delicious]). Resistant to powdery mildew and drought. Early ripening. Productivity to 38 t/ha. Fruits weighing 212 g or more, rounded conical shape. Contains 12.0 % solids, 0.64 % acid, 0.82 % pectin.



Orfey (Golden Delishes tetraploid × [Wolf River × OR18T13 (Wolf River × *M. atrosanguinea* 804/240-57)]). Resistant to powdery mildew and drought. Output up to 36 t/ha. Fruits to 290 g, oblong and conical. Pulp fragrant, sweet-sour taste. Contains 14.0 % solids; 0.85 % pectic substances, including 0.55 % soluble pectin.



Granatovoe (Idared × Balsgård 0247 E). High field resistance to powdery mildew. Frost- and drought-resistant, early ripening. Output up to 38 t/ha. Fruits with intense dark red pulp, weight to 264 g, juicy, with gentle aroma. Contains 12.5-13.0 % dry matter; 0.78 % pectin, at least 7.8 mg/100 g ascorbic acid, and 98.8 mg/100 g P-active catechins.

Fig. 3. Scab-resistant apple varieties jointly bred at the North-Caucasus Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture and the All-Russia Research Institute of Horticultural Breeding.

созревания. Выделены перспективные родительские формы, источники хороших вкусовых качеств плодов: полиплоиды – Голден Делишес тетраплоидный, Уэлси тетраплоидный, Боскопская красавица, Балсгард 0247 Е, Папировка тетраплоидная; диплоиды – Алкмене, Прима, Редфри, Кубань. Для использования в селекционных программах и ускоренного создания иммунных сортов яблони с высокими показателями адаптивности и качества плодов нами выделены сорта яблони: Марго, Орфей, Гранатовое, Ника, Кармен, Азимут, Фортуна и др. Определены генотипы яблони с высоким содержанием сахаров – Орфей, Чемпион; витамина С – Василиса, Союз, 44-24-49-ю; Р-активных веществ – Василиса, Любава, Марго, использование которых в селекционных программах будет способствовать созданию новых сортов с улучшенными биохимическими показателями плодов.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 13-04-96552 and 13-04-96592, and by the Administration of the Krasnodar Krai.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bagga H.S., Bonne D.M. Inheritance of resistance to *Venturia inaequalis* in crab apples. *Phytopathology*. 1968;58(8):1183-1187.
- Baker A.M. Ecophysiological aspects of zinc tolerance in silene maritime. *New Phytologist*. 1981;80:635-642.
- Blazek J., Papstein F. Breeding apples for scab tolerance at Holovousy. Eds. H. Schmidt, M. Kellerhals. *Progress in Temperate Fruit Breeding*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1994;21-25.
- Brown S.K., Maloney K.E. Genetic improvement of Apple: Breeding, Markers, Mapping and Biotechnology. *Apples: Botany, Production and Uses*. 2003;31-59.
- Dayton D.F. Coop 19, 20, 21 and 22 a new series of scab immune apple selections. *Illinois Stat. Hort. Soc.* 1979;112:31-32.
- Egorov E.A., Ilyina I.A., Prichko T.G., Dragavceva I.A., Popova V.P., Alekhina E.M., Alferov V.A., Artuch C.N., Chvostova I.V., Yaquba G.V., Cherkezova S.R., Podgornaya M.E., Smolyakova V.M., Efimova I.L., Ulyanovskaya E.V., Shafrostova N.K., Zaremuk R.Sh., Sergeev U.I., Lugovskoi A.P., Terenko G.N. *Adaptivnyy potentsial sadovykh kultur yuga Rossii v usloviyakh stressovykh temperatur zimnego perioda* [Adaptive potential of horticultural crops of southern Russia at stressing temperatures in winter]. Krasnodar, 2006. (in Russian)
- Eremin G.V. *Problemy adaptivnoy sistemy selektsii plodovykh kultur* [Problems of the adaptive system for fruit crop breeding]. *Problemy ekologizatsii sovremennogo sadovodstva i puti ikh resheniya* [Problems of Modern Gardening and Greening: Approaches to Their Solution]. Krasnodar, 2004:16-29. (in Russian)
- Eremin G.V. *Razrabotka programm issledovaniy i printsipy podbora kombinatsiy skreshchivaniya* [Development of research programs and the principles of choosing combinations for crossing]. *Sovremennye metodologicheskie aspekty organizatsii selektsionnogo protsessa v sadovodstve i vinogradarstve* [Modern Methodological Elements of the Organization of Breeding Process in Horticulture and Viticulture]. Krasnodar, 2012:97-105. (in Russian)
- Eremin G.V., Ulyanovskaya E.V., Kovalyova V.V. *Poliploidiya* [Polyploidy]. *Sovremennye metodologicheskie aspekty organizatsii selektsionnogo protsessa v sadovodstve i vinogradarstve* [Modern Methodological Elements of the Organization of Breeding Process in Horticulture and Viticulture]. Krasnodar, 2012:113-127. (in Russian)
- Ermakov A.I., Voznesenskaya V.V. (Eds.) *Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu khimicheskikh veshchestv dlya otsenki ka-*

- chestva urozhaya ovoshchnykh i plodovykh kultur. [Guidelines for the determination of chemical substances for assessing the quality of the harvest of vegetable and fruit crops]. Leningrad, 1979. (in Russian)
- Gessler C.A., Patocchi S., Sansavini S., Tartarini S., Gianfranceschi L. Venturia inaequalis resistance in apple. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2006; 25(6):473-503.
- GOST (State Standard) P 54697-2011 (EEK OON 50:2010) Yabloki svezhie, realizuemye v roznichnoy trgovoy seti [GOST 54697-2011 (UNECE standard FFV 50:2010) Fresh apples for retail]. Moscow, Standartinform Publ., 2013. (in Russian)
- Gudkovskiy V.A., Kashirskaya N.Y., Tsukanova E.M. Stress plodovykh rasteniy [Stress in fruit plants]. Michurinsk, Naukograd RF [Michurinsk: Science Town of the Russian Federation]. Voronezh, Quart Publ., 2005. (in Russian)
- Fischer C., Richter K. Results on fire blight resistance breeding of the Pillnits apple breeding programme. *Erwerbsobstbau.* 1999;41(2): 56-60.
- Kellerhals M., Meyer M. Aims of the apple breeding program at Wädenswil. Eds. H. Schmidts, M. Kellerhals. *Progress in Temperate Fruit Breeding.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1994;117-121.
- Keulemans J. Genetic diversity, ploudy and apomixis in putative qbince (Cydonia oblonga) × Apple (Malus domestica) Hybrids. 28th Int. Hort. Congr. Lisbon, 2010;1:202.
- Kozlovskaja Z.A. Sovershenstvovanie sortimenta yablони v Belarusi [Improved Assortment of Apple in Belarus]. Minsk, 2003. (in Russian)
- Metodicheskoe i analiticheskoe obespechenie issledovaniy po sadovodstvu [Methodical and Analytical Support for Research in Gardening]. Krasnodar, NCRRIH&V Publ., 2010. (in Russian)
- Nenko N.I. Kiseleva G.K., Karavaeva A.V., Ulyanovskaya E.V. Physiological characteristics of the adaptation of apple varieties of different ploidies to drought conditions in the Krasnodar Krai. *Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV = Scientific Works of the North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture.* 2013;1:70-75. (in Russian)
- Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rasteniy [Laboratory Manual on Plant Cytology]. Moscow, Kolos Publ., 1980. (in Russian)
- Prichko T.G., Artyukh S.N., Chalaya L.D. Nasledovanie khimicheskogo sostava plodov v selektsii yablони [Inheritance of the chemical composition of fruit in apple breeding]. *Sovremennye sorta i tekhnologii dlya intensivnykh sadov [Modern Cultivars and Technologies for Intensive Orchards].* Orel, 2013:185-188. (in Russian)
- Prichko T.G., Chalaya L.D. Vliyanie stress-faktorov v period vegetatsii na khimicheskiy sostav plodov yablони [Influence of stress factors during the growing season on the chemical composition of apple fruits]. *Fundamentalnye i prikladnye razrabotki, formiruyushchie sovremennyy oblik sadovodstva i vinogradarstva [Fundamental and Applied Research Forming the Modern Aspect of Horticulture and Viticulture].* Krasnodar, 2011:308-316. (in Russian)
- Programma i metodika selektsii plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur [The Program and Method of Breeding Fruit, Berry and Nut Crops]. Orel, 1995. (in Russian)
- Programma i metodika sortoizucheniya plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur [The Programme and Method of Trial of Fruit, Berry and Nut Crops]. Orel, 1999. (in Russian)
- Programma Severo-Kavkazskogo tsentra po selektsii plodovykh, yagodnykh, tsvetочно-dekorativnykh kultur i vinograda na period do 2030 goda [The Program of the North Caucasian Center for the Breeding of Fruit, Berry, Ornamental Crops, and Grapes for the Period up to 2030]. Krasnodar, NCRRIH&V Publ., 2013. (in Russian)
- Rudenko K.S., Dudukal G.D. Features of the application of the accelerated propionic-lacmoid method in chromosome set analysis. *Byulleten VIR = Bulletin of the Institute of Plant Industry (Leningrad).* 1971;18:69-72. (in Russian)
- Savelyev N.I. Sozdanie novykh sortov i donorov tsennykh priznakov [The Development of New Varieties and Donors of Traits]. Michurinsk, 2002. (in Russian)
- Savelyeva N.N., Savelyev N.I. Ekonomicheskaya effektivnost immunnykh k parshe sortov yablони v period polnogo plodonosheniya. [Economic efficiency of apple varieties immune to scab during full fructification]. *Optimizatsiya tekhnologo-ekonomicheskikh parametrov struktury agrotsenozov i reglamentov vozdeystviya plodovykh kultur i vinograda [Optimization of Technoeconomical Parameters of Agrocenosis Structures and Schedules of Cultivation of Fruit Crops and Grapes].* Krasnodar, 2008;1:60-64. (in Russian)
- Sedov E.N. Seleksiya i novye sorta yablони [Apple Breeding and New Cultivars]. Orel, 2011. (in Russian)
- Sedov E.N., Makarkina M.A., Levgerova N.S. Biokhimicheskaya i tekhnologicheskaya kharakteristika plodov genofonda yablони [Biochemical and Technological Characteristics of the Gene Pool of Apple]. Orel, 2007. (in Russian)
- Sedov E.N., Sedysheva G.A., Serova Z.M. Seleksiya yablони na poliploidnom urovne [Apple Breeding at the Polyploid Level]. Orel, VNIISPK Publ., 2008. (in Russian)
- Sedov E.N., Sedysheva G.A., Serova Z.M., Ulyanovskaya E.V. Raise of triploid varieties, a priority area in apple breeding. *Agrarnyy vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals.* 2010;75(9-10):71-74. (in Russian)
- Sedov E.N., Sedysheva G.A., Zhdanov V.V., Ulyanovskaya E.V., Serova Z.M. Breeding of scab-resistant triploid apple varieties. *Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2009;13(4):785-793. (in Russian)
- Ulyanovskaya E.V. An improved method of polyploidy immune and resistant to scab apple genotypes. *Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV = Scientific Works of the North Caucasian Region Research Institute of Horticulture and Viticulture.* 2014;5:22-28. (in Russian)
- Ulyanovskaya E.V., Suprun I.I. Accelerated breeding of apple genotypes with improved adaptability and commercial quality based on the laws of inheritance of relevant characters. *Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV = Scientific Works of the North Caucasian Region Research Institute of Horticulture and Viticulture.* 2013;1:47-52. (in Russian)
- UNECE Standard FFV-50, concerning the marketing and commercial quality control of apples, 2003.
- Van der Sluis A.A., Dekker M., Jager A., de Jongen W.M.F.J. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Agr. Food Chem.* 2001;8:3606-3013.
- Vigorov L.I. Opredelenie R-aktivnykh veshchestv [Determination of P-active substances]. *Trudy III seminarо po BAV [Proceedings of the III workshop on biologically active compounds].* Sverdlovsk, 1972. (in Russian)
- Yaquba G.V. Ekologizirovannaya zashchita yablони ot parshi v usloviyakh klimaticheskikh izmeneniy [Ecologically Sound Protection of Apple Trees from Scab at Climatic Changes]. Krasnodar, 2013. (in Russian)

Генетический контроль устойчивости образцов местного ячменя к ринхоспориозу

О.Н. Соболева , Г.С. Коновалова, Е.Е. Радченко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

Ринхоспориоз (возбудитель – *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis) – одна из наиболее вредоносных болезней ячменя. Высокая изменчивость гриба обуславливает появление новых агрессивных патотипов и, соответственно, потерю устойчивости сортов. Установлено, что большинство районированных в последнее время сортов ячменя и выявленных ранее источников устойчивости к *R. secalis* восприимчивы к этому патогену. Лишь один ген устойчивости, *Rrs9*, сохраняет эффективность против популяций возбудителя болезни в России. Цель исследования – поиск доноров эффективных генов устойчивости ячменя к возбудителю ринхоспориоза, способных легко передавать данный признак при гибридизации. Чем больше разнообразие генов, используемых в селекции, тем медленнее приспособление паразита и длительнее срок их «полезной жизни». Изучали наследование устойчивости к ринхоспориозу у 33 выделенных нами ранее местных образцов ячменя из Китая, Индии, Непала и Эквадора. Анализ взаимодействия тест-клонов *R. secalis* с растением-хозяином показал отличие аллелей, обуславливающих устойчивость к патогену у 32 форм ячменя, от эффективных ранее генов *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, а также от сохраняющего эффективность *Rrs9*. Установлено, что 30 образцов защищены новыми нетождественными генами устойчивости к ринхоспориозу. Предполагается, что образцы к-18398 и к-16231 из Китая имеют аллельные гены устойчивости к *R. secalis*, а ген (гены) устойчивости образца к-31075 (Непал) аллелен гену *Rrs9*. С помощью гибридологического анализа показано, что образцы к-3307, к-15868, к-18989 и к-3481 из Китая защищены эффективными генами устойчивости к *R. secalis*, различающимися между собой и не аллельными генам *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Образцы к-15868 и к-3481 имеют по два комплементарных рецессивных гена устойчивости к *R. secalis*, к-18989 – два рецессивных гена, а образец к-3307 – один рецессивный ген устойчивости к патогену. Гены устойчивости у этих форм проявляются на протяжении всех этапов онтогенеза растений.

Ключевые слова: ринхоспориоз; ячмень; гены устойчивости; патоген; вирулентность; устойчивость; гибридологический анализ.

Genetic control of scald resistance in barley landraces

O.N. Soboleva , G.S. Konovalova, E.E. Radchenko

N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Scald (*Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis pathogenic agent) is one of the most harmful barley diseases. A high variability of this fungi explains the occurrence of new aggressive pathotypes and, accordingly, loss of cultivar resistance. It was found that many recently selected varieties of barley and previously identified sources of resistance to *R. secalis* are now susceptible to the pathogen. There is only one gene, *Rrs9*, that maintains efficiency against pathogen populations in Russia. The aim of this study is to find donors of genes for effective resistance to scald with the ability to easily transfer this trait for hybridization. The inheritance of scald resistance in 33 barley landraces was studied. Analysis of the interaction between the pathogen test clones and the host plant revealed a difference between the alleles determining fungal resistance in 32 barley forms, the previously effective genes *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, and currently effective *Rrs9*. It was found that 30 accessions are protected by new unidentified genes for scald resistance. Accessions k-18398 and k-16231 from China are likely to possess allelic genes for scald resistance, while the gene (or genes) of accession k-31075 from Nepal is allelic to the *Rrs9* gene. It was demonstrated by hybridological analysis that accessions k-3307, k-15868, k-18989 and k-3481 are protected by effective genes for scald resistance, which differ from each other and which are not allelic to the *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* or *Rrs9* genes. Accessions k-15868 and k-3481 possess two complementary recessive genes for scald resistance, k-18989 has two recessive genes, and k-3307 carries one recessive gene for pathogen resistance. The resistance genes of these forms are manifested during all the stages of plant ontogenesis.

Key words: scald; barley; genes for resistance; pathogen; virulence; resistance; hybridological analysis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Соболева О.Н., Коновалова Г.С., Радченко Е.Е. Генетический контроль устойчивости образцов местного ячменя к ринхоспориозу. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):616-622. DOI 10.18699/VJ16.141

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Soboleva O.N., Konovalova G.S., Radchenko E.E. Genetic control of scald resistance in barley landraces. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):616-622. DOI 10.18699/VJ16.141

ORIGINAL ARTICLE

Received 14.09.2015

Accepted for publication 09.02.16

© AUTHORS, 2016

Ринхоспориоз, или окаймленная пятнистость листьев (возбудитель – *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis) – одна из наиболее вредоносных болезней ячменя. Ринхоспориоз широко распространен во всех основных районах производства ячменя, особенно в прохладных влажных областях умеренного пояса. В последние годы болезнь имеет тенденцию к нарастанию в зонах достаточного увлажнения – на Северо-Западе, в Северо-Кавказском, Центральном, Волго-Вятском регионах. Одна из причин возрастающей вредоносности патогена – высокая изменчивость гриба, приводящая к возникновению новых агрессивных патотипов и, соответственно, потере устойчивости ряда сортов. По разным литературным источникам, в настоящее время известно от 14 до 17 локализованных в хромосомах *Hordeum vulgare* L. генов устойчивости к ринхоспориозу (Bjørnstad et al., 2002; Hanemann et al., 2009), однако большинство из них неэффективны против популяций возбудителя болезни в России. По результатам многолетней работы с почти изогенными линиями ячменя установлено, что высокоэффективны против популяций патогена, распространенных на Северо-Западе России, лишь гены устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9* (Коновалова, Соболева, 2010). Эффективность генов *Rrs4* и *Rrs9* подтверждает и оценка сортов La Mesita (носитель гена *Rrs4*) и Kitchen (*Rrs9*) (Лебедева и др., 2006). В результате изучения коллекции ячменя выделен ряд образцов, устойчивых к ринхоспориозу и другим пятнистостям (Брискина, Терентьева, 2000; Анисимова, 2008), большинство из которых в наших экспериментах сильно поражаются *R. secalis*.

Одним из возможных путей поиска доноров генов устойчивости рассматривается изучение местных ячменей. Среди стародавних сортов-популяций зачастую находят источники адаптивно ценных признаков, в том числе и доноры новых генов устойчивости к болезням. В результате многолетнего иммунологического скрининга коллекции местных ячменей Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) выявлены устойчивые к ринхоспориозу формы (Коновалова, Соболева, 2010). Цель работы – изучение генетического контроля устойчивости ячменя к ринхоспориозу у выделенных в предыдущих исследованиях образцов.

Материалы и методы

Анализировали наследование устойчивости ячменя к ринхоспориозу у 33 устойчивых местных образцов ячменя из восьми стран различных эколого-географических регионов мира.

Для заражения растений использовали изоляты и моноспоровые культуры *R. secalis*, выделенные из растений, собранных в Ленинградской области, на Северном Кавказе, в Узбекистане, Сирии и Канаде. Изоляцию, клонирование и культивирование гриба проводили по методике Г.С. Коноваловой (2003) на картофельно-глюкозном агаре. В качестве инокулюма использовали культуру клонов гриба 14-дневного возраста.

При оценке ювенильной устойчивости использовали лабораторный метод инокуляции отрезков листьев ячменя, помещенных на поверхность агара (1 %), содержащего бензимидазол (50 мг/л). На поверхность листьев наносили

капли (объем 20 мкл) споровой суспензии гриба с концентрацией 500–700 тыс. конидий в 1 мл. Типы реакции растений учитывали через 21 день после инокуляции по 5-балльной шкале: 0 – отсутствие симптомов болезни; 1 – точечный некроз; 2 – некроз с хлорозом или без него, ограниченный диаметром инфекционной капли; 3 – некроз с хлорозом, распространяющийся по отрезку листа; 4 – окаймленный некроз, занимающий всю поверхность листа. Баллы 0, 1, 2 относили к реакции устойчивости, 3 и 4 – к реакции восприимчивости (Коновалова, 2003, 2008).

В полевых условиях растения в фазу кущения – выхода в трубку опрыскивали споровой суспензией гриба и накрывали полиэтиленовой пленкой на 12 ч для создания влажной камеры. Первый учет типа реакции проводили через 7–10 дней после инокуляции ячменя, второй – в фазу молочной спелости, третий – через месяц после заражения. Развитие болезни оценивали по 5-балльной шкале, по которой поражение до 2 баллов соответствует реакции устойчивости (поражено не более 30 % поверхности листьев нижнего яруса), 3–5 – реакции восприимчивости (поражено от 50 до 100 % поверхности листьев нижнего яруса) (Коновалова, 2008).

Генетический контроль устойчивости к ринхоспориозу изучали с помощью двух экспериментальных подходов: фитопатологический тест (метод тестирующих клонов) и гибридологический анализ. На основании теории Х. Флора (Flor, 1956) генотип растения-хозяина можно предположительно определить без гибридологического анализа, пользуясь изолятами возбудителей болезней, маркированными определенной вирулентностью. Если хотя бы один клон патогена, авирулентный к тестеру данного гена устойчивости, поражает изучаемый сорт, это означает, что сорт не имеет функционального аллеля данного гена.

Первоначально с помощью тест-клонов определяли генотипы восьми устойчивых образцов ячменя: к-3481, к-15868, к-18989, к-3307, к-16233 (Китай), к-27205, к-27768 (Индия) и к-22299 (Эквадор), заражая по пять отрезков листьев каждого из этих образцов и четырех почти изогенных линий с известными генами устойчивости к ринхоспориозу (*Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*) 30 моноспоровыми культурами гриба. В их числе были 15 случайно выбранных клонов, выделенных из листьев коллекционных форм ячменя, а также 15 клонов, изолированных из листьев устойчивых образцов к-15868 и к-18989 (Китай) с отдельными пятнами ринхоспориоза. В качестве контроля во всех экспериментах использовали универсально восприимчивый сорт Cambrinus (Голландия). Метод тест-клонов применили и для сравнения генетического контроля устойчивости к ринхоспориозу у 25 выявленных нами высокоустойчивых форм ячменя. Для заражения отрезков листьев устойчивых образцов, а также четырех почти изогенных линий с генами устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9* использовали семь клонов *R. secalis* с широким спектром вирулентности, отобранных по результатам предыдущего эксперимента.

Для изучения наследования устойчивости у четырех выделенных форм ячменя проводили скрещивания на опытном поле (Санкт-Петербург, Пушкин) по стандартной методике (Мережко и др., 1973). Три скрещиваемые фор-

мы (к-15868, к-18989, к-3481) однородны по устойчивости к патогену, а из гетерогенного образца к-3307 отобрали растения без симптомов поражения. Для определения числа генов, контролирующей устойчивость к болезни, образцы скрещивали с восприимчивым сортом *Cambrinus* из Голландии. Для изучения аллельных отношений генов устойчивости выделенные образцы скрещивали между собой, а также с почти изогенными линиями. В качестве тестеров эффективных, по литературным данным, генов устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *rrs9* (Лебедева и др., 2006; Коновалова, Соболева, 2010) использовали почти изогенные линии NIL4, NIL6, NIL7 и NIL9.

Гибридологический анализ проводили в поколениях F_2 и F_3 в полевых условиях и в лаборатории. При оценке F_2 гибридов в полевых условиях к классу устойчивых относили растения, тип реакции которых соответствовал баллам 0, 1 (высокая устойчивость) и 2 (умеренная устойчивость), к классу восприимчивых – 3 (восприимчивость) и 4, 5 баллов (высокая восприимчивость) (Коновалова, 2008). В лабораторных условиях инокуляцию растений и учет поражения F_1 гибридов и семей F_3 проводили по методике Г.С. Коноваловой (2003, 2008). Типы реакции на заражение оценивали по упомянутой ранее шкале, по которой 0–2 балла соответствуют реакции устойчивости, 3 и 4 балла – восприимчивости. Для определения соответствия полученных (фактических) данных по расщеплению теоретическим использовали критерий χ^2 (Лакин, 1990).

Результаты

При тестировании устойчивости восьми образцов к коллечения клонов, выделенных из природных популяций гриба, наблюдали дифференциальное взаимодействие паразита и хозяина. В табл. 1 представлены результаты опытов с семью наиболее «информативными» клонами гриба. При заражении экспериментального материала клонами 18, 19 и 23, вирулентными к тестерам известных генов устойчивости, наблюдали устойчивые типы реакций у образцов к-3307, к-15868, к-27768, к-16233 и к-22299, т. е. эти формы защищены аллелями генов устойчивости, не тождественных *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. На различие генетического контроля устойчивости к возбудителю ринхоспориоза у образцов к-18989, к-3481 и к-27205 и тестеров идентифицированных генов указывает дифференциальное взаимодействие изученных форм с клонами 1, 3 и 7.

Попарное сравнение устойчивости ячменя к клонам 1, 3, 7, 18, 19, 23 и 25 свидетельствует о том, что все восемь образцов защищены разными аллелями генов устойчивости (см. табл. 1). Например, восприимчивость к-3307 к клону 3 свидетельствует о различии генетического контроля устойчивости у этого образца и остальных изученных форм ячменя. Образец к-15868 имеет аллели генов устойчивости, отличающиеся от аллелей, которыми защищены образцы к-18989, к-3481, к-27205 и к-22299, на что указывают реакции на заражение клоном 19. Выявлено различие генетического контроля устойчивости у образцов к-15868 и к-27768 (взаимодействие с клоном 1 и 18), к-15868 и к-3307 (клоны 3, 7, 23), а также – у к-15868 и к-16233 (клон 7).

Применили метод тест-клонов для сравнения генетического контроля устойчивости к ринхоспориозу у 25

выделенных нами высокоустойчивых форм ячменя (табл. 2). Для заражения отрезков листьев устойчивых образцов, а также четырех почти изогенных линий с генами устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9* использовали семь клонов *R. secalis* с широким спектром вирулентности, упомянутых в табл. 1.

При заражении экспериментального материала тест-клонами у 24 образцов выявлены типы реакции на заражение, отличающиеся от типов реакций почти изогенных линий. Следовательно, эти образцы защищены аллелями генов устойчивости, не тождественных *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Так, 22 образца были устойчивы к клону 25, который обуславливал сильное поражение линий NIL 4, NIL 6 и NIL 7. Восприимчивость к этому же клону гриба образцов к-31068, к-31071 и к-25895 свидетельствует об отличии генетического контроля устойчивости у этих форм от линии NIL 9. Отличие аллелей генов устойчивости 21 образца и линии NIL 9 выявлено при заражении клонами 3 (17 образцов) и 23 (4 образца – к-19109, к-18982, к-8383, к-8386). Вывод о различии генетического контроля устойчивости подкрепляет также попарное сравнение взаимодействия изучаемых форм не только с упомянутыми четырьмя клонами, но и с рядом других. Лишь в одном случае установлено полное совпадение реакций на заражение тест-клонами: к-31075 и NIL 9. Не исключено, что образец к-31075 защищен геном *Rrs9*.

Попарное сравнение устойчивости образцов к семи клонам свидетельствует о том, что 32 образца защищены разными аллелями генов устойчивости (см. табл. 1, 2). Например, восприимчивость образца к-13049 (Китай) к клону 1 демонстрирует отличие генетического контроля признака у этой формы от образцов к-13050, к-18398, к-29108, к-16231, к-31068, к-31071, к-31075, к-27286, к-18982, к-6841, к-9143 и к-25893, к клону 3 – от образцов к-19109, к-8383 и к-8396 (см. табл. 2), а также от образцов к-15868, к-18989, к-3481, к-27768, к-22299 и к-27205 (см. табл. 1), а по типу реакции к клону 19 – от образцов к-3307 и к-16233 (см. табл. 1). Образец к-18982 (Китай) устойчив ко всем клонам патогена. Следовательно, генетический контроль устойчивости к *R. secalis* данного образца и остальных 32 изученных форм ячменя различен. Исключение составляют озимые образцы к-18398 и к-16231 из Китая, для которых характерны идентичные типы реакции на заражение всеми клонами патогена. Вероятно, данные образцы защищены тождественными аллелями генов устойчивости к ринхоспориозу, отличающимися от генов, идентифицированных ранее.

Анализировали гибриды от скрещивания четырех устойчивых образцов ячменя из Китая с восприимчивым сортом *Cambrinus*. Растения F_1 сильно поражались патогеном (3, 4 балла) в фазе всходов, что указывает на рецессивный характер наследования устойчивости у изучаемых форм. На искусственном инфекционном фоне анализировали расщепление F_2 гибридов (табл. 3). Расщепление по моногибридной схеме выявили в F_2 к-3307 $\times$ *Cambrinus* (один рецессивный ген устойчивости). В остальных комбинациях наблюдали расщепление по двум генам устойчивости. Соотношение устойчивых (R) и восприимчивых (S) фенотипов в F_2 к-18989 $\times$ *Cambrinus* не противоречит ожидаемому при контроле признака дву-

Table 1. Resistance of barley accessions against *R. secalis* clones

Accession	Origin	<i>R. secalis</i> clone no.						
		1	3	7	18	19	23	25
k-3307	China	S*	S	S	S	R	R	R
k-15868	China	S	R	R	S	R	S	R
k-18989	China	S	R	S	S	S	S	S
k-3481	China	S	R	S	S	S	S	R
k-27768	India	R	R	R	R	R	S	R
k-27205	India	S	R	R	S	S	S	S
k-22299	Ecuador	R	R	R	R	S	R	R
k-16233	China	S	R	S	S	R	S	S
NIL 4 (<i>Rrs4</i>)	Sweden	S	S	R	S	S	S	S
NIL 6 (<i>rrs6</i>)	Sweden	R	R	S	S	S	S	S
NIL 7 (<i>rrs7</i>)	Sweden	R	R	R	S	S	S	S
NIL 9 (<i>Rrs9</i>)	Sweden	R	R	R	S	S	S	R

* Hereinafter R, accession resistance; S, susceptibility.

Table 2. Types of responses of barley accessions to inoculation with *R. secalis* test clones

Accession	Origin	<i>R. secalis</i> clone no.						
		1	3	7	18	19	23	25
k-13049	Russia	S	S	S	R	S	R	R
k-13050	Russia	R	S	R	S	S	S	R
k-12136	Russia	S	S	S	S	S	S	R
k-15147	Russia	S	S	R	R	S	R	R
k-27286	Russia	R	S	R	R	R	S	R
k-18398	China	R	S	R	R	S	S	R
k-16231	China	R	S	R	R	S	S	R
k-18529	China	S	S	R	R	R	R	R
k-18986	China	S	S	S	S	S	R	R
k-18982	China	R	R	R	R	R	R	R
k-6841	China	R	S	R	S	S	S	R
k-17737	China	S	S	S	S	R	S	R
k-19754	India	R	S	R	R	R	R	R
k-29108	India	R	S	R	R	S	S	R
k-19109	India	S	R	R	R	R	R	R
k-19940	India	S	S	S	S	S	R	R
k-31068	Pakistan	R	R	S	S	S	R	S
k-31069	Pakistan	S	S	S	R	R	S	R
k-31071	Pakistan	R	S	S	R	R	S	S
k-31075	Nepal	R	R	R	S	S	S	R
k-26097	Uzbekistan	S	S	R	S	R	R	R
k-9143	Spain	R	S	R	R	S	R	R
k-25893	Spain	R	S	S	S	R	R	S
k-8383	Cyprus	S	R	R	R	R	R	R
k-8386	Syria	S	R	S	S	R	R	R
NIL 4	Sweden	S	S	R	S	S	S	S
NIL 6	Sweden	R	S	S	S	S	S	S
NIL 7	Sweden	R	R	R	S	S	S	S
NIL 9	Sweden	R	R	R	S	S	S	R

Table 3. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₂ hybrids from crossing of resistant accessions and susceptible variety Cambrinus

Cross	Ratio of phenotypes R:S		χ^2	Probability. <i>P</i>
	observed	expected		
k-3307 × Cambrinus	31:76	1:3	0.900	0.25–0.50
k-18989 × Cambrinus	51:59	7:9	0.305	0.50–0.75
k-15868 × Cambrinus	10:124	1:15	0.336	0.50–0.75
k-3481 × Cambrinus	8:105	1:15	0.132	0.50–0.75

Note: Here and in Tables 5 and 6 $\chi^2_{0.05} = 3.84$.

Table 4. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₃ hybrids from crossing of resistant accessions and susceptible variety Cambrinus

Cross	Ratio of phenotypes R:RS:S		χ^2	<i>P</i>
	observed	expected		
k-3307 × Cambrinus	21:35:24	1:2:1	1.481	0.25–0.50
k-18989 × Cambrinus	5:13:2	7:8:1	2.963	0.20–0.25
k-15868 × Cambrinus	3:10:6	1:8:7	3.441	0.10–0.20
k-3481 × Cambrinus	2:12:5	1:8:7	2.532	0.25–0.50

Note: $\chi^2_{0.05} = 5.99$.

Table 5. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₂ hybrids from crossing of resistant accessions

Cross	Ratio of phenotypes R:S		χ^2	<i>P</i>
	observed	expected		
k-3307 × k-15868	36:65	19:45	1.716	0.10–0.20
k-3307 × k-18989	75:38	37:27	3.394	0.05–0.10
k-18989 × k-3307	48:22	37:27	3.322	0.05–0.10
k-18989 × k-3481	34:53	121:135	2.338	0.10–0.20
k-18989 × k-15868	38:52	121:135	0.918	0.25–0.50
k-15868 × k-3307	36:65	19:45	1.716	0.10–0.20
k-15868 × k-18989	52:68	121:135	0.774	0.25–0.50
k-15868 × k-3481	18:85	31:225	2.787	0.05–0.10
k-3481 × k-15868	18:85	31:225	2.787	0.05–0.10
k-3481 × k-18989	34:53	121:135	2.338	0.10–0.20
k-3481 × k-3307	28:53	19:45	0.924	0.25–0.50

мя рецессивными генами устойчивости. Расщепление в F₂ к-15868 × Cambrinus и к-3481 × Cambrinus удовлетворяет предположению о контроле признака двумя комплементарными рецессивными генами устойчивости.

Расщепление F₃ гибридов от скрещивания устойчивых образцов с сортом Cambrinus анализировали в лабораторных условиях в фазе всходов (табл. 4). Соотношение устойчивых (R), расщепляющихся (RS) и восприимчивых (S) семей подтверждает результаты анализа F₂. Таким образом, гены устойчивости у обсуждаемых форм ячменя проявляются на протяжении всех этапов онтогенеза растений.

Опыты с тест-клонами гриба показали, что все четыре образца защищены разными генами устойчивости. В то же время гены, идентифицированные с помощью тест-клонов, могут являться новыми эффективными аллелями уже известных локусов.

Изучили аллельные отношения генов устойчивости к *R. secalis* у выделенных образцов (табл. 5), а также ранее идентифицированных генов *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, *Rrs9* (табл. 6). Анализировали расщепление F₂ гибридов в период, когда поражение восприимчивого контроля (сорт Cambrinus) составляло 70 %. Поражение растений F₂ в этот период варьировало от 0 до 60 %.

Table 6. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₂ hybrids from crossing of scald-resistant accessions and tester lines

Cross	Ratio of phenotypes R:S		χ^2	P
	observed	expected		
k-3307 × NIL 4	88:26	13:3	1.232	0.25–0.50
k-3307 × NIL 6	49:58	7:9	0.182	0.50–0.75
k-3307 × NIL 7	53:61	7:9	0.348	0.50–0.75
k-3307 × NIL 9	97:15	13:3	2.109	0.10–0.20
k-18989 × NIL 4	87:20	55:9	1.897	0.10–0.20
k-18989 × NIL 6	65:53	37:27	0.360	0.50–0.75
k-18989 × NIL 7	88:49	37:27	2.316	0.10–0.20
k-18989 × NIL 9	113:14	55:9	0.97	0.25–0.50
k-15868 × NIL 4	67:14	49:15	1.709	0.10–0.20
k-15868 × NIL 6	98:25	49:15	0.664	0.25–0.50
		19:45	147.237	> 0.005
k-15868 × NIL 7	39:70	19:45	1.938	0.10–0.20
k-15868 × NIL 9	89:21	49:15	1.158	0.25–0.50
k-3481 × NIL 4	81:22	49:15	0.248	0.50–0.75
k-3481 × NIL 6	38:65	19:45	2.562	0.10–0.20
k-3481 × NIL 7	41:73	19:45	2.152	0.10–0.20
k-3481 × NIL 9	72:18	49:15	0.592	0.25–0.50

Соотношение фенотипов удовлетворяет предположению о том, что образцы к-3307, к-15868, к-18989 и к-3481 защищены разными аллелями генов устойчивости. Эти гены отличаются и от идентифицированных ранее генов *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, *Rrs9*. Результаты опытов подтверждают также вывод о моногенном контроле устойчивости у образца к-3307 и дигенном – у к-15868, к-18989, к-3481. Исследуемые выборки малы, однако выявленное расщепление, несомненно, свидетельствует о неаллельности генов устойчивости.

При анализе F₂ от скрещивания образца к-15868 с почти изогенной линией, защищенной рецессивным геном *rrs6*, мы наблюдали расщепление, противоречащее гипотезе о контроле признака устойчивости двумя комплементарными рецессивными генами. Соотношение фенотипов соответствовало расщеплению по одному доминантному и двум комплементарным рецессивным генам устойчивости.

Обсуждение

Наши эксперименты в очередной раз продемонстрировали значение для селекции местных форм, большая часть которых собрана еще во времена первых экспедиций ВИР. Определение генотипов 33 образцов ячменя с помощью тестирующих клонов *R. secalis* показало отличие аллелей генов устойчивости у 32 образцов от *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Исключение составил образец к-31075 из Непала, типы реакции которого на заражение грибом были идентичны типам реакции линии NIL 9. Вероятно, данный образец защищен геном *Rrs9*. Большинство выделенных образцов защищены нетождественными аллелями генов устойчи-

вости к ринхоспориозу, за исключением двух образцов из Китая – к-18398 и к-16231.

Для популяций *R. secalis* характерен широкий спектр изменчивости по признаку вирулентности. Многие коммерческие сорта ячменя, защищенные известными генами устойчивости, со временем становятся восприимчивыми к грибу даже на фоне интенсивных обработок фунгицидами (Abang et al., 2006; Zaffarano et al., 2006). Все выделенные нами образцы, за исключением к-18982 из Китая, дифференциально взаимодействовали с клонами гриба, однако сохраняли устойчивость в течение шести–семи лет изучения. В течение четырех лет мы проводили мониторинг степени поражения почти изогенных линий. На начальном этапе работы линии с генами *Rrs4*, *rrs6* и *rrs7* проявляли высокую устойчивость к патогену, однако затем изменение состава инокулюма и благоприятные для развития болезни погодные условия обусловили потерю устойчивости этих линий, как и многих выделенных нами устойчивых сортов (Коновалова, Соболева, 2010). Следует отметить, что мы выделили и клоны, вирулентные к единственному эффективному гену устойчивости *Rrs9* (см. табл. 1 и 2). В полевых условиях на чрезвычайно жестком инфекционном фоне степень поражения почти изогенной линии NIL 9 в течение свыше десяти лет практически не изменялась и составляла 0–1 балл (отсутствие симптомов заболевания либо поражение 5–10 % поверхности листьев нижнего яруса). Мы полагаем, что вирулентные к сортам с геном *Rrs9* клоны гриба менее конкурентоспособны в сравнении с остальными и вытесняются в природных популяциях *R. secalis*. Следует также отметить, что даже на устойчивых растениях, без отчет-

ливых симптомов болезни, гриб способен образовывать споры (Thirugnanasambandam et al., 2011; Zhan et al., 2012).

К сожалению, пока нет надежных критериев для прогнозирования срока «полезной жизни» генов устойчивости. Лишь расширение генетического разнообразия возделываемых сортов может способствовать его продлению. Для селекции предлагаются 30 образцов, которые защищены новыми нетождественными аллелями генов устойчивости к ринхоспориозу. Наиболее эффективно могут быть использованы образцы к-3307, к-15868, к-18989 и к-3481, у которых изучено наследование устойчивости к патогену. Образцы защищены генами устойчивости к *R. secalis*, которые проявляются на протяжении всех этапов онтогенеза растений, различаются между собой и не аллельны генам *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Образцы к-15868 и к-3481 имеют по два комплементарных рецессивных гена устойчивости к *R. secalis*, к-18989 – два рецессивных гена, а образец к-3307 – один рецессивный ген устойчивости к патогену. Комплементарное взаимодействие генов образцов к-15868 и к-3481 может являться результатом аддитивного эффекта двух генов, каждый из которых по отдельности не имеет фенотипического проявления.

В F_2 от скрещивания образца к-15868 (два комплементарных рецессивных гена устойчивости) с линией NIL 6, несущей рецессивный ген *rrs6*, соотношение фенотипов соответствовало расщеплению по одному доминантному и двум комплементарным рецессивным генам устойчивости. Наиболее вероятное объяснение – смена доминирования гена *rrs6*. В литературе описаны подобные случаи – например, ген устойчивости *Lr23* к возбудителю бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia triticina* Erikss.), проявление которого против разных клонов гриба имеет доминантный либо рецессивный характер (Одинцова, Пеуша, 1984). Не исключена также и ошибка классификации фенотипов. В любом случае ген *rrs6* и гены устойчивости образца к-15868 не аллельны, на что указывает расщепление в F_2 к-15868 $\times$ NIL 6 (см. табл. 6).

Возрастающая генетическая однородность возделываемых культур способствует ускорению адаптивной микроэволюции вредных организмов. Результаты многочисленных исследований показывают, что по характеру фенотипического проявления и наследования нельзя отличить потенциально преодолеваемую возбудителями болезней и вредителями устойчивость от непреодолеваемой (длительной). И большие, и малые гены устойчивости зерновых культур к вредным организмам дифференциально взаимодействуют с патогенами. Следовательно, возможность приспособления вредного организма вполне очевидна в обоих случаях. Рациональная стратегия селекции предусматривает, прежде всего, расширение генетического разнообразия возделываемых сортов. Известно несколько способов восстановления генетического разнообразия зерновых культур, обсуждаемых в отечественной и зарубежной научной печати: чередование во времени сортов с разными генами устойчивости; «мозаики» (возделывание одновременно большого числа сортов с разными генами устойчивости в ареале патогена); селекция мультилинейных сортов (механических смесей фенотипически сходных линий, различающихся по генам устойчивости); пирамидирование (объединение в одном

генотипе различных факторов устойчивости). Выявленные нами устойчивые формы могут быть использованы в любой стратегии селекции и в различных комбинациях.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abang M.M., Baum M., Ceccarelli S., Grando S., Linde C.C., Yahyaoui A.H., Zhan J., McDonald B.A. Pathogen evolution in response to host resistance genes: evidence from fields experiments with *Rhynchosporium secalis* on barley. *Phytopathology*. 2006;96(6):S2.
- Anisimova A.V. Search for sources of resistance to barley net blotch, foot rot, and scald. *Vtoraya Vserossiyskaya konferentsiya «Sovremennye problemy immuniteta rasteniy k vrednym organizmam»*. [Proc. 2nd All Russia Conference “Current Problems of Plant Immunity to Harmful Organisms”]. Saint-Petersburg, 2008;80-83. (in Russian)
- Björnstad A., Patil V., Tekauz A., Marøy A.G., Skinnies H., Jensen A., Magnus H., MacKey J. Resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley (*Hordeum vulgare* L.) studied by near-isogenic lines: I. Markers and differentials isolates. *Phytopathology*. 2002;92(7): 710-720.
- Briskina O.S., Terentieva I.A. Screening of a barley collection for scald resistance. *Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News*. 2000;1: 105-106. (in Russian)
- Flor H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 1956;8:29-54.
- Hanemann A., Schweizer G.F., Cossu R., Wicker T., Röder M.S. Fine mapping, physical mapping and development of diagnostic markers for the *Rrs2* scald resistance gene in barley. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(8):1507-1522. DOI 10.1007/s00122-009-1152-9.
- Konvalova G.S. *Izmenchivost' vozbuditelya rinkhosporioza yachmenya pri bespolom razmnozhenii. Metodicheskie ukazaniya* [Variability of the barley scald pathogenic agent at sexless propagation, a technical guide]. Saint-Petersburg, VIR Publ., 2003. (in Russian)
- Konvalova G.S. *Rinkhosporioz. Izuchenie geneticheskikh resursov zernovykh kultur po ustoychivosti k vrednym organizmam. Metodicheskoe posobie* [Scald: study of genetic resources for pest resistance in cereal crops, a technical guide]. Moscow, Rosselkhozakademiya Publ., 2008;129-135. (in Russian)
- Konvalova G.S., Soboleva O.N. Barley accessions from South-East Asia as donors of resistance to the scald causative agent (*Rhynchosporium secalis* (Oud.)). *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2010;44(3):248-254. (in Russian)
- Lakin G.F. *Biometriya* [Biostatistics]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1990. (in Russian)
- Lebedeva L.V., Tvaruzek L., Konvalova G.S. Virulence analysis of Russian and Czech populations of the barley scald agent *Rhynchosporium secalis*. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2006;40(4):337-342. (in Russian)
- Merezhko A.F., Erohin L.M., Judin A.E. *Effektivnyy metod opyleniya zernovykh kultur. Metodicheskie ukazaniya* [An efficient method of grain crop pollination. Technical guide]. Leningrad, VIR Publ., 1973. (in Russian)
- Odintsova I.G., Peusha Kh.O. On the composite structure of the locus *Lr23*, controlling resistance to brown rust in wheat. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Bulletin of Applied Botany, of Genetics, and Plant Breeding*. 1984;85:13-19. (in Russian)
- Thirugnanasambandam A., Wright K.M., Atkins S.D., Whisson S.C., Newton A.C. Infection of *Rrs1* barley by an incompatible race of the fungus *Rhynchosporium secalis* expressing the green fluorescent protein. *Plant Pathol.* 2011;60(3):513-521. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02393.x.
- Zaffarano P.L., McDonald B.A., Zala M., Linde C.C. Global hierarchical gene diversity analysis suggests the fertile crescent is not the center of origin of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology*. 2006;96(9):941-950. DOI 10.1094/PHYTO-96-0941.
- Zhan J., Yang L., Zhu W., Shang L., Newton A.C. Pathogen populations evolve to greater race complexity in agricultural systems – evidence from analysis of *Rhynchosporium secalis* virulence data. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38611. Available at: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377678/pdf/pone.0038611.pdf>). DOI 10.1371/journal.pone.0038611.



Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе

О.Н. Шуплецова^{1, 2}✉, И.Н. Щенникова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого», Киров, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет», Киров, Россия

Представлены результаты изучения хозяйственно ценных свойств регенерантных линий ячменя, полученных методом клеточной селекции на селективных средах *in vitro* с ионами алюминия, водорода и полиэтиленгликолем. Созданы генотипы, превышающие исходный и стандартный сорта: по уровню индекса длины корневой (регенеранты 0,9–1,2 %, стандарт 0,8 %) и засухоустойчивости (регенеранты 17,8–45,2 %, стандарт 8,5 %) – в лабораторных исследованиях, по продуктивным показателям – в вегетационном испытании (повышение всхожести на 12 %, продуктивной кустистости – на 21 %, озерненности колоса – в 2,3 раза, массы зерна с растения – в 1,5 раза). Показатель массы зерна с одного растения коррелировал с уровнем подщелачивания в зоне ризосферы исследуемых растений в стрессовых условиях вегетационного опыта ($r = 0,908$). В результате иммунологической оценки на инфекционном фоне выявлены регенерантные линии, характеризующиеся низкой степенью поражения фитопатогенными грибами. Преимущество по урожайности генотипов регенерантного происхождения перед исходными сортами и стандартами особенно проявилось в 2010 г. в провокационных условиях кислых почв и недостатка влаги, когда в полевых испытаниях регенерантные генотипы стабильно обеспечивали на 10,0–43,2 % более высокую урожайность, чем стандартный сорт. Доля регенерантных линий на этапе конкурсного сортоиспытания возросла с 8,3 (2006 г.) до 32,4 % (2014 г.). Регенеранты, обладающие высокой комбинационной способностью, используются в качестве родительских форм при скрещивании. Получены новые сорта ячменя Форвард и Бионик на основе регенерантных линий 917-01 и 496-07. В условиях эдафического стресса (pH 3,8–4,5; Al^{3+} 0,5–9,6 мг/100 г почвы) урожайность сортов достигала: Форвард – 5,5 т/га, Бионик – 6,6 т/га, превышение над стандартом составляло 113–128 %.

Ключевые слова: ячмень; алюминий; засуха; клеточная селекция; регенерант; оценка; алюмоустойчивость; засухоустойчивость; урожайность; сорт.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шуплецова О.Н., Щенникова И.Н. Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):623–628. DOI 10.18699/VJ16.183

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shupletsova O.N., Shchennikova I.N. Results of using cell technologies for creation of new barley varieties resistant against aluminum toxicity and drought. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):623–628. DOI 10.18699/VJ16.183

ORIGINAL ARTICLE

Received 04.12.2015

Accepted for publication 15.03.2016

© AUTHORS, 2016

Results of using cell technologies for creation of new barley varieties resistant against aluminum toxicity and drought

O.N. Shupletsova^{1, 2}✉, I.N. Shchennikova¹

¹ North-East Agricultural Research Institute, Kirov, Russia

² Vyatka State University, Kirov, Russia

Results of a study of economically valuable parameters of barley regenerative lines obtained by cell selection on selective media with aluminum, hydrogen ions and polyethylene glycol are presented. Genotypes superior to the initial variety and standard variety have been identified under laboratory conditions: root length index (regenerants: 0.9–1.2 %; standard: 0.8 %) and drought resistance (regenerants: 17.8–45.2 %; standard: 8.5 %); productive parameters under growth chamber conditions (12 % increase in germination ability, 21 % increase in productive plant stand, 2.3-fold increase in grain number per ear, 1.5-fold increase in weight of grains per plant). The parameter "weight of grains per plant" correlates with the level of alkalization of the rhizosphere zone of the investigated plants under stressful conditions in growth chamber experiments ($r = 0.908$). Regenerant plants are typically much less affected by phytopathogenic fungi.

The genotypes screened in selective systems *in vitro* had advantages over the initial varieties and standard varieties in productivity, especially under provocative conditions of acid soils and moisture deficit in 2010. As a result of field tests, the genotypes of regenerative origin were identified that had consistently shown a 10.0–43.2 % higher productivity than the standard variety over several years. The proportion of varieties regenerated at the stage of competitive variety trials increased from 8.3 % (2006) to 32.4 % (2014). The varieties regenerated with high combining ability are used as the parental forms in crosses. New barley varieties Forward and Bionik have been developed on the basis of regenerative lines 917-01 and 496-07. Under edaphic stress (pH 3.8–4.5; Al^{3+} 0.5–9.6 mg/100 g soil), Forward has productivity up to 5.5 t/ha and Bionik, 6.6 t/ha; which is 113–128 % higher than the standard.

Key words: barley; aluminum; drought; cell selection; regenerative; estimation; aluminum resistance; drought resistance; productivity; variety.

В почвах северо-востока Нечерноземной зоны России основными факторами, негативно влияющими на продуктивность ячменя, являются повышенная кислотность и токсичность алюминия, стрессовое давление которых усугубляется в условиях нестабильности выпадения осадков и повышения среднемесячных температур в период вегетации растений. Получение сортов с комплексной устойчивостью к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям возделывания актуально в селекции зерновых культур и альтернативно к химической мелиорации для преодоления алюмотоксичности кислых почв (Неттевич, 2008; Lisitsyn et al., 2011). Физиолого-биохимические механизмы устойчивости, проявляющиеся на клеточном уровне, позволяют повышать эффективность селекции внедрением клеточных технологий. При создании новых форм растений с высоким потенциалом устойчивости к абиотическим стрессорам перспективно использовать соматоклональную изменчивость, лежащую в основе клеточного отбора *in vitro*. Мутации, возникающие в процессе культивирования изолированных клеток и ткани в результате генетической и эпигенетической изменчивости, делают возможным получение алюмоустойчивых генотипов культурных растений методом клеточной селекции. Использование селективных сред *in vitro* позволяет имитировать естественные стрессовые условия, что обеспечивает экспрессию генов устойчивости и дает возможность отбирать нужные варианты (Larkin, Scowcroft, 1981; Бутенко, 1999; Muzyuan et al., 2003).

К настоящему времени разработаны эффективные схемы отбора устойчивых каллусных линий ячменя на селективных питательных средах с ионами H^+ , Al^{3+} и полиэтиленгликолем в качестве осмотика. Селективные агенты вносят на этапах пролиферации и морфогенеза каллусной ткани отдельно и в различных комбинациях для создания форм с комплексной устойчивостью. В каллусной культуре получают соматоклоны, устойчивые к ионной токсичности алюминия и осмотическому стрессу, в том числе и к комплексному воздействию этих факторов (Широких и др., 2009; Шуплецова и др., 2015). Семенное потомство регенерированных из каллусной ткани растений – перспективный материал для адаптивной селекции. Тем не менее возникающая *in vitro* изменчивость не всегда адаптивна: отдельные признаки могут изменяться в сторону как повышения, так и понижения значений по сравнению с исходным сортом (Шахматов, 1999; Сельскохозяйственная биотехнология, 2003). Существует мнение, что регенеранты часто обладают более низкой продуктивностью относительно стандарта при отсутствии стресса (Жученко, 2001), что, возможно, вызвано пролонгированным негативным влиянием селективных условий *in vitro*. Однако селекция ориентирована на создание сортов, способных давать стабильно высокий урожай на богатом агрофоне и не снижать его при наличии стрессовых факторов. Поэтому дополнительный отбор полученных регенерантных линий на всех этапах селекционного процесса уже в условиях *in vivo*, а также оценка их хозяйственной ценности – важный этап успешного создания стрессоустойчивых сортов с использованием клеточных технологий.

На протяжении ряда лет (2000–2012 гг.) в лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого методом клеточной селекции в условиях *in vitro* с алюмокислым и осмотическим стрессом получали растения-регенеранты ячменя, семенное потомство которых передавалось селекционерам. В настоящее время имеется достаточное количество семенного материала ячменя регенерантного происхождения для получения адаптивных генотипов.

Цель работы заключалась в подтверждении перспективности метода клеточной селекции ячменя для создания высокоурожайных сортов, толерантных к комплексному воздействию ионной токсичности водорода, алюминия и осмотическому стрессу.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования служили генотипы ячменя (*Hordeum vulgare* L.) регенерантного происхождения, полученные по ранее описанным методикам путем клеточного отбора на селективных средах *in vitro* (Широких и др., 2009; Шуплецова и др., 2015), и их исходные сорта.

Лабораторный скрининг

Устойчивость сорта к действию алюминия оценивали в водной культуре на основании расчета индекса длины корней (ИДК) – соотношения средней длины корней в стрессовых и контрольных условиях. Семена (всхожесть не менее 90 %) предварительно проращивали на влажной фильтровальной бумаге, трехдневные проростки помещали в водный раствор с ионами алюминия (30 мг/л) и водорода (рН 4,0). Контролем служили растения, помещенные в воду без алюминия при рН 6,0. После семи-дневного культивирования по результатам биометрических показателей корневой системы рассчитывали ИДК (Родина, Солодянкина, 1999).

Для определения уровня устойчивости растений к осмотическому стрессу оценивали способность зерновок к прорастанию в дистиллированной воде с добавлением сахарозы (15,8 %), обеспечивающей осмотическое давление раствора 14 атм (Климашевский, 1988). Повторность опыта – четырехкратная.

Почвенная культура в вегетационном опыте

Семена высевали в вегетационные сосуды с кислой дерново-подзолистой почвой, содержащей 12,78 мг/100 г подвижного (в ионной форме) Al при рН 4,1. Для контроля использовали почву с 0,45 Al мг/100 г при рН 5,5. Растения культивировали до получения семенного потомства. По окончании вегетации проводили анализ структуры продуктивности и измеряли уровень рН как в области ризосферы корней, так и в свободной от корневой системы. В каждом варианте анализировали по 21 растению.

Полевые испытания

Семенное потомство от полученных *in vitro* растений-регенерантов в поколениях R_3 – R_7 оценивали по методике Государственной комиссии по сортоиспытанию (1985) в 2006–2014 гг. в условиях конкурсного испытания на дерново-подзолистой среднесуглинистой почве со слабокис-

лой ($\text{pH}_{\text{сол}} 5,1\text{--}5,5$; следы алюминия) и кислой ($\text{pH}_{\text{сол}} 4,0$; Al^{3+} 0,5–9,6 мг/100 г почвы) реакцией среды; повторность – четырехкратная, учетная площадь делянки – 10 м².

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом дисперсионного анализа с использованием встроенного статистического пакета EXCEL (MS Office 2007) и AGROS (версия 2.07).

Результаты и обсуждение

Генотипы ячменя, созданные путем клеточной селекции, и их исходные сорта оценивали на провокационных фонах в условиях лабораторных (с алюминием/водородом и осмотиком), вегетационных и полевых (с алюминием/водородом) опытов. В сравнительный анализ вовлекали стандартные сорта, считавшиеся эталоном урожайности на почвах с богатым агрофоном.

Исследования алюмоустойчивости трех исходных сортов и шести их регенерантных форм, проведенные в условиях водной культуры, показали повышение показателя ИДК (до 0,9–1,17) у регенерантных линий 917-01, 781-04, 780-04 и 530-98, полученных в результате отбора *in vitro* каллусных культур на селективных средах с ионами Al^{3+} и H^+ , по сравнению с исходными сортами и стандартом (ИДК 0,7–0,8). Однако положительный эффект наблюдался только при вовлечении в клеточную селекцию генотипов с исходно низким уровнем стрессоустойчивости (ИДК $\leq 0,8$). Отбор на клеточном уровне генотипов, обладавших изначально высоким ИДК ($> 1,0$), не приводил к его повышению (табл. 1). По-видимому, генетический потенциал роста корневой системы в стрессовых условиях таких сортов, как Новичок, исчерпан и поэтому здесь возможно только негативное проявление соматоклональной изменчивости по данному признаку.

Регенерантные генотипы, полученные на средах с ионами алюминия и осмотиком, оценивали в лабораторных исследованиях на комплексную устойчивость к заданным стрессорам. Выявлены генотипы, превышающие стандартный и исходный сорта не только по показателям ИДК (регенеранты 0,9–1,2 %, стандарт 0,8 %), но и по устойчивости к осмотическому стрессу (регенеранты 17,8–45,2 %, стандарт 8,5 %) – 496-07, 514-07, 515-08, 482-09. Отмечена устойчивость к комплексному стрессу токсичности алюминия и засухи у генотипа 917-01, несмотря на получение этой регенерантной линии на средах с алюминием, но без внесения осмотика.

В условиях вегетационного опыта изучали структурные и физиологические показатели двух регенерантных линий и исходного сорта. Сравнительный анализ показателей проводили относительно сортов, контрастных по устойчивости к токсичности алюминия в полевых испытаниях: Новичок – устойчивый, Белгородский 100 – неустойчивый (табл. 2). Регенеранты в стрессовых условиях вегетационного опыта имели более высокие показатели по сравнению с устойчивым Новичком и исходным сортом 999-93: всхожести (в среднем на 12 %), продуктивной кустистости (на 21 %), озерненности колоса (в 2,3 раза), массы зерна с растения (в 1,5 раза). Вместе с тем отмечена тенденция к снижению (до 30 %) высоты растений обеих регенерантных линий по сравнению с исходным сортом и сортами сравнения.

Известно, что всхожесть растений и средообразующая активность корневой системы в условиях почвенного стресса – значимые показатели в устойчивости сортов (Климашевский, 1991). Полевая всхожесть семян регенерантных генотипов на провокационном фоне была на уровне устойчивого сорта Новичок (56,3 % у линии 917-01) или превышала его (75,0 % у линии 496-07). Также у регенерантных растений обнаружена повышенная физиологически обусловленная способность корневой системы изменять уровень pH в зоне ризосферы, что проявлялось в оптимизации кислотности (сдвиг в щелочную сторону на 1,0–1,5 ед. pH) на кислом фоне (рисунки). Показатель подщелачивания в зоне ризосферы растений исследуемых растений в стрессовых условиях вегетационного опыта коррелировал с наиболее значимым продуктивным показателем – массой зерна с одного растения ($r = 0,908$ при $p > 0,95$). На контрольном фоне значительных генотипических различий не наблюдали.

Данные факты указывают на проявление возможных механизмов устойчивости к почвенному стрессу токсичности алюминия, активированных у генотипов в процессе клеточной селекции.

Регенерантные линии наряду с устойчивостью к абиотическим стрессам обладали толерантностью и к поражению фитопатогенными грибами (фузариозно-гельминтоспориозные корневые гнили, полосатая и сетчатая пятнистость). В результате иммунологической оценки на естественном и инфекционном фонах выделены генотипы 917-04, 530-98, 496-07, 781-04, у которых степень поражения болезнями была достоверно ниже в сравнении со стандартными сортами Нур и Биос 1 (корневые гнили в полтора–два раза, полосатая пятнистость в восемь раз, сетчатая пятнистость в два–три раза) (Щенникова и др., 2013б). Очевидно, наблюдаемые кросс-адаптации становятся возможными, благодаря активации на клеточном и молекулярном уровнях ряда механизмов, участвующих в формировании общей ответной реакции растения на стрессовые воздействия.

В настоящее время подтверждена эффективность использования регенерантов ячменя в практической селекции (Щенникова и др., 2013а). Доля регенерантных генотипов на заключительном этапе селекции (конкурсное сортоиспытание) возросла с 8,3 % (2006 г.) до 32,4 % (2014 г.), достигая в отдельные годы 50,0 % от всего количества изученных генотипов. Регенеранты, обладающие высокой комбинационной способностью, активно используются в качестве родительских форм при скрещивании.

Формы (генотипы), прошедшие скрининг в селективных системах *in vitro*, имели преимущество перед исходными сортами по урожайности, особенно в провокационных условиях кислых почв и недостатка влаги в 2010 г. (табл. 3). В результате полевых испытаний выявлены генотипы регенерантного происхождения, на протяжении ряда лет стабильно обеспечивающие на 10,0–43,2 % более высокую урожайность, чем стандартный сорт.

Полученные путем клеточной селекции 11 регенерантных линий ячменя включены в коллекцию Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ФГБНУ ВНИИР) в качестве генетических источников толерант-

Table 1. Estimation of stress resistance in the seed progeny of regenerated plants and parental varieties grown in a water culture

Genotype	Parentage	Root length index
Bios 1 standard		0.84±0.01
999-93	Parental genotype	0.76±0.10
917-01	Regenerant from 999-93	0.94±0.04*
781-04	Regenerant from 999-93	0.91±0.05
780-04	Regenerant from 999-93	1.11±0.09*
Abava × Icarus	Parental genotype	0.80±0.11
530-98	Regenerant from Abava × Icarus	1.17±0.11*
Novichok	Parental genotype	1.20±0.13
440-05	Regenerant from Novichok	0.82±0.13*
441-05	Regenerant from Novichok	0.83±0.13*

Note: Regenerating plants were obtained on selective nutrient media with 40 mg/L Al³⁺ and pH 4.0

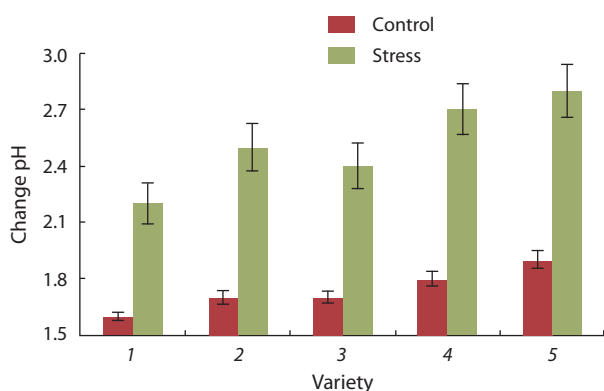
* The difference from the original variety significant at $p > 0.95$.

Table 2. Structural indices of varieties and regenerants of barley in a growth chamber experiment

Genotype	Productive tillering, pcs.		Grains per ear		Grain weight per plant, g	
	1	2	1	2	1	2
Belgorod-100 sensitive	8.7 ± 1.2	2.7 ± 0.7	27.0 ± 0.9	9.0 ± 0.9	25.5 ± 1.3	3.8 ± 0.1
Novichok tolerant	10.0 ± 1.5	4.0 ± 1.0	23.0 ± 1.2	23.0 ± 1.2	25.1 ± 1.5	5.2 ± 0.1
999-93 initial variety	10.3 ± 0.9	3.3 ± 0.9	19.0 ± 1.1	12.0 ± 0.8	20.8 ± 2.2	4.5 ± 0.1
917-01 regenerant	10.0 ± 0.8	4.0 ± 0.6	18.0 ± 1.5	27.0 ± 1.4*	20.6 ± 2.0	6.0 ± 0.1*
496-07 regenerant	21.0 ± 2.2*	7.3 ± 0.4*	22.0 ± 1.3*	21.0 ± 0.8*	46.0 ± 3.5*	6.5 ± 0.1*

Note: 1, control: 0.45 mg Al/100 g of soil at pH 5.5; 2, stress: 12.78 Al mg/100 g soil at pH 4.1.

*The difference between the regenerant and the original variety significant at $p > 0.95$.



Amplitude of pH change in the rhizosphere zone of barley plants under control and stress conditions of the growth chamber experiment.

Varieties: Belgorodsky 100 (1); Novichok (2); 999-9 (3); 917-01 (4); 496-07 (5).

ности к засухе и повышенному содержанию в почве ионов водорода и алюминия (табл. 4).

На основе регенерантных линий, созданных путем клеточной селекции и последующего отбора в полевых испытаниях, получены новые сорта ячменя Форвард и Бионик.

Сорт Форвард (заявка на патент № 65195/8558125, дата приоритета 18.11.2014 г.) создан на основе регенерантной линии 917-01 путем отбора в каллусной культуре *in vitro* на селективных питательных средах с ионной токсичностью Al³⁺ и H⁺. Главное достоинство генотипа – толерантность к кислым почвам наряду с устойчивостью к полеганию. Сорт Форвард рекомендован к использованию на кислых дерново-подзолистых почвах Волго-Вятского региона. В условиях эдафического стресса (pH 3,8–4,5; Al³⁺ 0,5–9,6 мг/100 г почвы) его урожайность достигала 5,5 т/га, в обычных условиях в среднем за три года – 3,7 т/га (табл. 5). Отмечена устойчивость к засухе в период налива зерна. Высокая урожайность сорта сочетается с устойчивостью (поражение менее 1,0 %) к пыльной головне, сетчатой и темно-бурой пятнистостям листьев и средней устойчивостью к полосатой пятнистости (поражение 5–6 %), поражению шведской мухой. Экономический эффект нового сорта при выращивании элиты – 21,4 тыс. руб./га при выращивании на благоприятном фоне и 33,7 тыс. руб./га при выращивании на почвах с повышенной кислотностью. В 2014 г. сорт Форвард передан на Государственное сортоиспытание.

Сорт Бионик (заявка на патент № 65197/8558123, дата приоритета 18.11.2014 г.) создан на основе регенерантной линии 496-07 путем отбора в каллусной культуре *in vitro*

Table 3. Comparison of regenerant lines and their parental varieties
(a provocative background: pH 3.8 to 4.5; Al^{3+} 0.5 to 9.6 mg/100 g soil), 2010

Genotype	Parentage	Productivity, t/ha	Percentage of the parental genotype
552-98	Parental variety	5.2	–
496-07	Regenerant lines from 552-98	7.5	144.2
507-07		7.5	144.2
510-07		7.3	140.3
503-07		6.6	126.9
495-07		6.0	111.5
999-93	Parental variety	4.7	–
917-01	Regenerant lines from 993-99	5.3	112.8
780-04		5.1	108.5
781-04		5.1	108.5
Novichok	Parental variety	4.9	–
441-05	Regenerant line from Новичок	5.1	104.1

Table 4. Characteristics of the conditions for obtaining barley somaclones in a callus culture,
included in the catalog of the VIR* collection

Regeneration line	Selective background at different callus development stages		Stress tolerance
	proliferation	organogenesis	
530-98	Al^{3+} 40 mg/L pH 4.0	Al^{3+} 20 mg/L pH 4.0	Aluminum toxicity
917-01			
774-04			
775-04			
780-04	15 % polyethylene glycol	10 % polyethylene glycol	Water deficiency
781-04			
494-07	Al^{3+} 30 mg/L pH 4.0	10 % polyethylene glycol	Aluminum toxicity Water deficiency
496-07			
507-07			
514-07			
515-07			

Table 5. Results of the competitive trial of cv. Forward

Accession	Productivity, t/ha			
	2012	2013	2014	average
control background (pH 5.1 to 5.5, Al^{3+} 0 mg/100 g soil)				
Forward	3.60	2.27	5.31	3.73
Nur - standard	4.28	1.82	4.28	3.46
LSD ₀₅	0.81	0.39	0.63	
stressing background (pH 3.8 to 4.5, Al^{3+} 0.5 to 9.6 mg/100 g of soil)				
	2009	2010	2011	
Forward	6.17	5.30	5.04	5.50
Nur - standard	6.14	4.10	4.44	4.89
LSD ₀₅	no difference	0.29	0.47	

Table 6. Results of the competitive trial of cv. Bionic

Accession	Productivity, t/ha			
	2012	2013	2014	Среднее
control background (pH 5.1 to 5.5, Al^{3+} 0 mg/100 g soil)				
Bionic	6.15	2.18	5.12	4.48
Nur - standard	4.30	2.35	4.28	3.64
LSD ₀₅	0.71	0.30	0.63	
stressing background (pH 3.8 to 4.5, Al^{3+} 0.5 to 9.6 mg/100 g of soil)				
	2009 г.	2010 г.	2011 г.	
Bionic	6.65	7.50	5.77	6.64
Nur - standard	5.60	4.30	5.65	5.19
LSD ₀₅	0.57	0.89	0.23	

на селективных средах с ионами H^+ , Al^{3+} и полиэтиленгликолем в качестве осмотика. Главное достоинство генотипа – толерантность к кислым почвам наряду с высокой устойчивостью к полеганию и формированию зерна с высокими технологическими свойствами. В лабораторных испытаниях отмечено его превышение над стандартом и исходным сортом в 1,5 и 2,3 раза по уровню ИДК. В конкурсных сортоиспытаниях НИИСХ Северо-Востока Бионик формировал урожайность до 7,5 т/га, превышая стандарт Нур на благоприятном фоне на 0,9 т/га, на фоне повышенного содержания в почвенном растворе ионов водорода и алюминия – 1,5 т/га (табл. 6). Преимущество Бионика проявилось особенно наглядно на провокационном по кислотности фоне (рН 4,2) в условиях аномально жаркого и засушливого 2010 г.: урожайность на фоне эдафического стресса составляла 7,5 т/га, что на 3,2 т/га больше, чем у стандарта. Наряду с высокой урожайностью сорт характеризуется устойчивостью к пыльной головне на естественном и искусственном инфекционных фонах.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования клеточных технологий в селекционных программах устойчивости к стрессовым воздействиям различной природы. Высокие урожайность и комбинационная способность сортов регенерантного происхождения существенно расширяют перечень хозяйственно ценных генотипов, адаптированных к комплексу стрессовых факторов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Butenko R.G. Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologii na ikh osnove [Cell biology of higher plants in vitro and biotechnology based on them]. Moscow, FBK-Press Publ., 1999. (in Russian)
 Klimashevskiy E.L. Otsenka kislotoustoychivosti rasteniy [Estimation of acid resistance of plants]. Diagnostika ustoychivosti rasteniy k stressovym vozdeystviyam [Diagnosis of tolerance of stress factors in plants]. Leningrad, 1988;97-100. (in Russian)
 Klimashevskiy E.L. Geneticheskiy aspekt mineralnogo pitaniya rasteniy [Genetic Aspects of Mineral Nutrition of Plants]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1991. (in Russian)
 Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 1981;60:197-214.

Lisitsyn E.M., Shchennikova I.N., Shupletsova O.N. Cultivation of barley on acid sod-podzolic soils of north-east of Europe. Barley: Production, Cultivation and Uses. Ed. S.B. Elfson. New York: Nova Publ. 2011;49-92.
 Metodika Goskomissii po ispytaniyu selskokhozyaystvennykh kultur [The methodology of the State Committee for the Testing of New Varieties of Agricultural Plants]. Moscow, Kalininskaya oblastnaya tipografiya Publ., 1985. (in Russian)
 Muyuan Y.Z., Jianwei P., Lilin W., Qing G., Chunyuan H. Mutation induced enhancement of Al tolerance in barley cell lines. Plant Sci. 2003; 164:17-23.
 Nettevich E.D. Izbrannye trudy. Seleksiya i semenovodstvo yarovykh zernovykh kultur [Selected works: Breeding and seed production of spring grain crops]. Moscow; Nemchinovka, NIISKh TsRNZ Publ., 2008. (in Russian)
 Rodina N.A. Solodyankina M.M. The screening of barley genotypes tolerant of Al^{3+} in a water culture. Nauchnye osnovy strategii adaptivnogo rastenievodstva Severo-Vostoka evropeyskoy chasti Rossii: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii 9-10 oktyabrya 1996 g. [Proceedings of the research and practice conference "Scientific Bases of Adaptive Strategies of Plant Industry in Northeastern European Russia", Oct. 9-10, 1996]. Kirov, 1999;2;31-39. (in Russian)
 Shayakhmetov I.F. Somaticheskii embriogenezi i seleksiya zlakovykh kultur [Somatic Embryogenesis and Breeding of Cereals]. Ufa, BashSU Publ., 1999. (in Russian)
 Shchennikova I.N., Shupletsova O.N., Kunilova A.V. Barley regenerants as a parental material for breeding in a changing climate. Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka = An Agrarian Science of Euro-North-East. 2013a;3(34):9-11. (in Russian)
 Shchennikova I.N., Shupletsova O.N., Sheshegova T.K. Barley regenerants with complex resistance to stress factors. Innovatsionnye tekhnologii vozdeystviya selskokhozyaystvennykh kultur v Nechernozem'e. Sbornik dokladov Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 75-letiyu Vladimirovskogo NIISKh (Suzdal, 2-4 iyulya 2013 goda) [Innovative technologies of cultivation of agricultural crops in the Non-Chernozem Zone. Proc. Sci. Conf. Dedicated to the 75th anniversary of Vladimir Agricultural Research Institute (Suzdal, July 2-4, 2013)]. Ivanovo, PresSTO Publ., 2013b;2:33-36. (in Russian)
 Shevelukha V.S. (Ed.) Selskokhozyaystvennaya biotekhnologiya [Agricultural Biotechnology]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2003. (in Russian)
 Shirokikh I.G., Shupletsova O.N., Shchennikova I.N. In vitro development of barley varieties tolerant of Al in acidic soil. Biotekhnologiya = Biotechnology. 2009;3:40-48. (in Russian)
 Shupletsova O.N., Shchennikova I.N., Shirokikh I.G. Creation of barley genotypes with complex resistance to edaphic stresses by methods of cell culture. Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka = Russian Agricultural Sciences. 2015;2:3:16-20. (in Russian)
 Zhuchenko A.A. Adaptivnaya sistema seleksii rasteniy (ekologo-geneticheskie osnovy) [Adaptive Plant Breeding (Environmental and Genetic Basis)]. Moscow, RUDN Publ., 2001;1. (in Russian)



Устойчивость к листовым фитопатогенам гибридных (F_4 , F_5) форм яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в различных эколого-географических условиях

Е.И. Рипбергер¹✉, Н.А. Боме¹, Д. Траутц²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия

² Университет прикладных наук города Оснабрюк, Оснабрюк, Германия

Поиск и создание исходного материала, устойчивого к неблагоприятным факторам окружающей среды и адаптированного к меняющимся погодным условиям, – одно из перспективных направлений селекции сельскохозяйственных растений. В статье представлены результаты изучения устойчивости гибридов (F_4 , F_5) яровой мягкой пшеницы к основным листовым фитопатогенам (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal, *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp. и *Puccinia recondita* Rob. ex. Desm f. sp. *tritici* Eriks) в различных почвенно-климатических условиях. Испытания проводились в течение двух вегетационных периодов (2013–2014 гг.) в трех географических пунктах: Тюменская область (Россия), Земля Баден-Вюртемберг (Германия) и Земля Нижняя Саксония (Германия), существенно различавшихся по природно-климатическим условиям в указанные годы. Оценка устойчивости гибридов к листовым заболеваниям проводили на естественном инфекционном фоне. Показано влияние комплекса абиотических факторов на распространенность фитопатогенных грибов в пунктах исследования. Выделены гибридные комбинации, менее восприимчивые по сравнению с другими гибридами к мучнистой росе, бурой ржавчине и пятнистостям, а также гибриды, обладающие устойчивостью к комплексу идентифицированных фитопатогенов. Отмечено, что проходившие экологическое испытание гибридные формы имели различные показатели биологической устойчивости растений в географических пунктах исследований. Гибрид ♀ Cara × ♂ Лютеценс 70 в обоих пунктах Германии имел относительно высокий показатель биологической устойчивости растений и обладал, согласно данным полевых исследований, во всех географических пунктах устойчивостью к комплексу идентифицированных фитопатогенов. Экологическое испытание новых генотипов растений в значительно различающихся по комплексу биотических и абиотических факторов условиях среды является одним из методов выявления устойчивости к фитопатогенам и выделения форм культурных растений с высокой адаптацией.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L.; фитопатогенные грибы; экологические факторы; устойчивость к болезням.

Resistance of hybrid (F_4 , F_5) forms of the spring soft wheat (*Triticum aestivum* L.) to leaf phytopathogens under different ecological and geographical conditions

E.I. Ripberger¹✉, N.A. Bome¹, D. Trautz²

¹ Tyumen State University, Tyumen, Russia

² University of Osnabrueck, Osnabrueck, Germany

The search for and creation of the initial material steady against adverse environmental factors and adapted to constantly changing weather conditions have always been some of the most promising directions of selection of agricultural plants. Results of studying the resistance of spring soft wheat (F_4 , F_5) hybrids to the main leaf phytopathogens (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal, *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp. and *Puccinia recondita* Rob. ex. Desm f. sp. *tritici* Eriks) under different soil and climatic conditions are presented. Tests were carried out within two vegetative periods (2013–2014) in three geographic locations: Tyumen region (Russia), Baden-Württemberg (Germany) and Lower Saxony (Germany). These areas significantly differed in climatic conditions during the study years. The assessment of resistance to leaf diseases in the hybrids was carried out in the settings of natural infection. The influence of a complex of abiotic factors on the prevalence of phytopathogenic fungi at the study sites has been demonstrated. Hybrid combinations that were less susceptible to powdery mildew, brown rust and spot blotch than other hybrids have been identified, and so have been the hybrids that have resistance to all the phytopathogens identified. It was noted that the hybrid forms under the ecological test had different indicators of biological resistance of plants across the geographic study sites. The ♀ Cara × ♂ Lutescents 70 hybrid at both German sites had rather a high index of biological resistance of plants and possessed, according to field data, complex resistance to the main phytopathogenic fungi at all geographic sites.

Ecological testing of new plant genotypes under environmental conditions strongly differing in biotic and abiotic factors is one of effective methods to reveal resistance to phytopathogens and to identify highly adapted cultured plants.

Key words: *Triticum aestivum* L.; phytopathogenic fungi; environmental factors; resistance to diseases.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Рипбергер Е.И., Боме Н.А., Траутц Д. Устойчивость к листовым фитопатогенам гибридных (F_4 , F_5) форм яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в различных эколого-географических условиях. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):629–635. DOI 10.18699/VJ16.184

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ripberger E.I., Bome N.A., Trautz D. Resistance of hybrid (F_4 , F_5) forms of the spring soft wheat (*Triticum aestivum* L.) to leaf phytopathogens under different ecological and geographical conditions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):629–635. DOI 10.18699/VJ16.184

Пшеница (*Triticum* L.) – одна из основных культур мирового рынка зерна, характеризующаяся высокой экологической пластичностью и занимающая площадь 218,6 млн га (Phillips, Norton, 2012). По данным С.Н. Богословского (2008), в Российской Федерации на пищевые цели расходуется 17,5–18,0 млн т зерна, на семена – 11–12 млн т, на корм скоту и птице – 36–40 млн т. При этом ежегодные мировые потери урожая зерна пшеницы от грибных болезней в среднем составляют 20 % (Кольес и др., 2006; Генетические основы..., 2008). Применение химических средств защиты сельскохозяйственных растений в агроценозах приводит к накоплению пестицидов в цепях питания и появлению толерантных форм фитопатогенов. Поэтому особое значение в обеспечении населения страны безопасной и качественной продукцией, а также в направленном развитии экологически ориентированного сельского хозяйства имеет создание сортов и выделение форм, обладающих генетической устойчивостью к неблагоприятным биотическим стрессорам (Макарова, 2012; Нуриева, Исаев, 2013; Павлюшин, 2013). Ускорению селекционного процесса, направленного на выявление доноров устойчивости к фитопатогенным грибам, может способствовать экологическое испытание отобранного материала в существенно различных условиях среды.

Цель исследования – изучение устойчивости гибридов (F_4 , F_5) яровой мягкой пшеницы к основным грибным болезням в различных почвенно-климатических условиях.

Материалы и методы

Объекты исследования – растения четырех гибридных комбинаций (F_4 , F_5) яровой мягкой пшеницы: ♀Cara × ♂Скэнт 1, ♀Cara × ♂Лютесценс 70, ♀Hybrid × ♂Лютесценс 70 и ♀Cara × ♂Скэнт 3. Гибриды получены в 2009 г. с использованием модели неполных диаллельных скрещиваний (Griffing, 1956a, b) методом принудительного опыления (Дорофеев и др., 1990) на экспериментальном участке биостанции «Озеро Кучак» Тюменского государственного университета. Родительские формы представлены пятью образцами из мировой коллекции ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР): сорта отечественной селекции Скэнт 1 и Скэнт 3 (Россия; Тюменская область, var. *lutescens*), сорта иностранной селекции Cara (Мексика, var. *erythrospermum*) и Лютесценс 70 (Казахстан, var.

lutescens), а также константный гибрид (обозначен как Hybrid, Мексика, var. *ferrugineum*). Сорта, отобранные по результатам предварительного изучения в Тюменском опорном пункте ВИР, различались по проявлению селекционно ценных признаков (продолжительность вегетационного периода, высота растений, устойчивость к полеганию, болезням, зерновая продуктивность). Мексиканский сорт Cara, по данным GRIS (Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale), является носителем гена устойчивости *Lr13* в «устойчивом» аллельном состоянии. По результатам многолетней оценки в Тюменском опорном пункте ВИР, устойчивость сортов Cara и Hybrid к фитопатогенным грибам варьировала от очень высокой до низкой.

Испытание созданных гибридов проводили в трех географических пунктах. Первый располагался в России (Тюменская область, экспериментальный участок биостанции «Озеро Кучак» Тюменского государственного университета), а два других – в Германии (Земля Баден-Вюртемберг, экспериментальный участок Вальдорфской школы и Земля Нижняя Саксония, опытная станция Waldhof). Пункты исследований находились на значительном расстоянии друг от друга и, следовательно, различались по основным эколого-географическим характеристикам (Рипбергер и др., 2014, 2015; Боме и др., 2015).

Закладку полевых опытов во всех пунктах исследований проводили по единой методике, составленной на основании методических указаний Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (Градчанинова и др., 1987) и Б.А. Доспехова (1985). Растения выращивали на делянках площадью 1 м², количество высеванных семян 600 шт., междурядья 15 см, глубина посева 5–6 см, повторность опыта четырехкратная.

Для изучения устойчивости образцов к листовым грибным болезням (мучнистая роса, бурая листовая ржавчина и пятнистости) использовали комплексный способ оценки. В полевых условиях на естественном инфекционном фоне в течение всего вегетационного периода (с появления первых симптомов заболевания до усыхания листьев) по методическим указаниям (Гриценко и др., 2005) определяли: распространенность (P , %), индекс развития заболевания (R , %) и степень поражения растений. Устойчивость образцов пшеницы к болезням определяли по шкале: 1 – очень низкая; 3 – низкая; 5 – средняя; 7 – высокая; 9 – очень высокая (Международный клас-

Hydrothermal conditions in research sites

Index	Month	Research site					
		LK		WS		WH	
		2013	2014	2013	2014	2013	2014
Daily average temperature, °C	April	–	–	11.00	12.50	8.30	11.80
	May	9.70	12.90	12.70	13.80	11.90	19.40
	June	17.30	16.60	17.90	16.70	15.70	16.00
	July	19.10	14.70	22.90	20.10	19.70	18.10
	August	17.20	18.10	20.60	15.40	18.70	16.70
	September	10.20	8.50	–	–	–	–
	Total	73.50	70.80	85.10	78.50	74.30	82.00
Precipitation, mm	April	–	–	46.90	96.80	23.00	54.00
	May	63.40	60.90	144.50	79.40	61.30	109.00
	June	4.10	25.50	41.80	44.60	42.20	83.50
	July	126.70	122.40	168.00	256.30	15.40	175.00
	August	37.60	37.80	129.90	192.70	72.10	108.10
	September	36.30	24.80	–	–	–	–
	Total	268.10	271.40	531.10	669.80	214.00	529.60
HTC		1.19	1.23	2.31	2.69	0.64	2.02
Mean value		1.21		2.50		1.33	

Note: LK, Lake Kuchak biological research station; WS, experimental site of the Waldorf school; WH, Waldhof experimental station; HTC, hydrothermal coefficient.

сификатор..., 1984). Идентификацию патогенов по морфологическим признакам (Методы..., 1982) выполняли с помощью микроскопической техники и влажной камеры в лаборатории биотехнологических и микробиологических исследований кафедры ботаники, биотехнологии и ландшафтной архитектуры Института биологии ТюмГУ (Попкова и др., 2005).

В качестве стандартов взяты сорта мягкой яровой пшеницы, допущенные к использованию в каждом пункте исследований: Россия, Тюменская область – Новосибирская 15, Иргина; Германия, Земля Баден-Вюртемберг – Ashby, Scirocco; Германия, Земля Нижняя Саксония – Eminent, Granus.

Гидротермические условия в годы исследований (2013–2014) в географических пунктах были контрастными (см. таблицу). Так, при оценке уровня влагообеспеченности территории с использованием гидротермического коэффициента Г.Т. Селянинова экспериментальный участок Вальдорфской школы по усредненным данным за два вегетационных периода характеризовался избыточным увлажнением (ГТК = 2,50), а экспериментальные участки в Западной Сибири и опытной станции Waldhof были слабозасушливыми (ГТК 1,21 и 1,33 соответственно).

Описание погодных условий выполнено с использованием данных официальных интернет-ресурсов и метеостанции, расположенной недалеко от экспериментального участка опытной станции Waldhof (Погода и климат, 2014; Proplanta..., 2014). Расчет и интерпретацию гидротермического коэффициента увлажнения Селянинова проводили по методическим указаниям Н.Ф. Белова и И.А. Смирнова (2006), с учетом даты начала и окончания вегетационного периода.

Результаты и обсуждение

Н.И. Вавилов (1918) неоднократно подчеркивал, что введение в культуру сортов, полученных в результате скрещиваний исходных форм с различной степенью устойчивости к патогенам, является наиболее эффективным средством борьбы с инфекционными болезнями (ржавчина, мучнистая роса и пятнистости). Большое внимание он уделял изучению устойчивости злаков к болезням в разных эколого-географических условиях. По мнению Г.Ф. Говоровой (2011), проведение экологического испытания позволяет оценить восприимчивость созданного материала к другим расам патогенов, тем самым значительно сокращая продолжительность селекционного процесса.

На территории Германии ряд исследователей (Hoffmann, Schmutterer, 1999; Mebrate et al., 2008; Miedaner, Korzun, 2012) идентифицируют у сортов мягкой пшеницы гены устойчивости к возбудителям мучнистой росы (*Pm1*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3c*, *Pm5*, *Pm6*, *Pm9* и их комплексы *Pm3d+4b*) и бурой ржавчины (*Lr9*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr23* и *Lr34*). В Западной Сибири хорошую защиту яровой пшеницы от рас бурой листовой ржавчины обеспечивали ювенильные (*Lr23* в комбинации с *Lr2a*, *Lr10*, *Lr16*, а также *Lr26* и *Lr19*) и возрастные (*Lr13*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* по отдельности и в сочетании с другими генами) гены устойчивости (Сочалова, Лихенко, 2013). Авторы также указывают, что сорта яровой пшеницы иностранной селекции (США, Германия, Эстония и Швеция) являются носителями генов устойчивости (*Pm1*, *Pm2*, *Pm3d*, *Pm4b*, *Pm5*, *Pm6+2*, *Pm9m*) к распространенным в Западной Сибири расам мучнистой росы. По мнению Е.И. Гуляевой (2013), наиболее эффективными генами устойчивости по отношению к возбудителю бурой листовой ржавчины

пшеницы в большинстве регионов России остаются *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr41*, *Lr45* и *Lr47*.

Возникновение и развитие патологического процесса инфекционных заболеваний растений в полевых условиях определяется комплексом абиотических факторов: степенью увлажненности территории, ее температурными условиями и световой энергией (Черемисинов, 1973). Поскольку распространение фитопатогенных грибов в значительной степени зависит от условий окружающей среды, фитопатогенная активность в географических пунктах наших исследований была неодинакова.

Так, поражение мучнистой росой (*Erysiphe graminis* DC.) гибридных (F_4) форм в вегетационный период 2013 г. отмечалось только на опытном участке Waldhof. Распространенность болезни изменялась от 15 (♀Сага × ♂Скэнт 1) до 50 % (♀Сага × ♂Лютесценс 70, ♀Hybrid × ♂Лютесценс 70, ♀Сага × ♂Скэнт 3), индекс развития болезни – от 5 (♀Сага × ♂Скэнт 3) до 15 % (♀Сага × ♂Лютесценс 70). На экспериментальных участках биостанции «Озеро Кучак» и Вальдорфской школы в рассматриваемый период симптомов болезни не обнаружено.

В 2014 г. пораженные растения выявлены во всех пунктах исследования, максимальная (100 %) распространенность патогена – эпифитотия – отмечена на экспериментальном участке биостанции «Озеро Кучак». Индекс развития заболевания мучнистой росой у гибридов здесь изменялся от 25 (♀Сага × ♂Скэнт 1) до 50 % (♀Сага × ♂Скэнт 3). Наименьшая распространенность болезни в вегетационный период 2014 г. у гибридных (F_5) форм была зарегистрирована на экспериментальном участке Вальдорфской школы – от 3 (♀Сага × ♂Скэнт 1) до 10 % (♀Hybrid × ♂Лютесценс 70). На растениях гибридной комбинации (♀Сага × ♂Скэнт 3) и стандартных сортов признаков поражения не обнаружено. На опытной станции Waldhof в 2014 г. распространенность заболевания мучнистая роса варьировала от 10 (сорта Granus, Eminent и гибрид ♀Сага × ♂Скэнт 1) до 50 % (♀Hybrid × ♂Лютесценс 70), индекс развития болезни – от 0 (стандарт Eminent и гибрид ♀Сага × ♂Скэнт 1) до 30 % (♀Сага × ♂Лютесценс 70) (рис. 1).

Наибольшая распространенность заболевания отмечена в слабозасушливых и очень засушливых условиях, сложившихся на экспериментальном участке биостанции «Озеро Кучак» в 2014 г. (ГТК = 1,23) и на опытной станции Waldhof в 2013 г. (ГТК = 0,64). Сумма осадков при температуре выше 10 °C составила там 197,4 и 101,9 мм соответственно. Причиной активного распространения фитопатогена при дефиците влаги могло стать снижение тургора в листьях растений пшеницы (Черемисинов, 1973). Э. Гойман (1954) отмечал, что прорастание конидий *E. graminis* происходит с максимальной скоростью при низких температурах – от 6–10 °C. В наших исследованиях периодам максимального распространения патогена способствовало понижение температуры по сравнению со средними многолетними значениями: на экспериментальном участке биостанции «Озеро Кучак» – в 2014 г. в июне (на 0,5 °C) и июле (на 4,1 °C); на опытной станции Waldhof – в 2013 г. в мае (на 1,9 °C) и июне (на 0,8 °C).

Поражение листьев пятнистостями в годы исследований выявлено на экспериментальных участках био-

станции «Озеро Кучак» и Вальдорфской школы. Распространенность данного заболевания в Западной Сибири в 2013 г. у гибридов варьировала от 3 (♀Сага × ♂Лютесценс 70) до 30 % (♀Hybrid × ♂Лютесценс 70), у сортов – от 3 (Granus) до 25 % (Новосибирская 15), что значительно ниже по сравнению с 2014 г.: от 5 (♀Сага × ♂Скэнт 3) до 30 % (♀Сага × ♂Скэнт 1) и от 5 (Scirocco) до 100 % (Ashby, Granus). Средняя интенсивность поражения (*R*) у гибридов в оба года исследований изменялась здесь от 5 (♀Сага × ♂Скэнт 1, ♀Сага × ♂Лютесценс 70) до 15 % (♀Hybrid × ♂Лютесценс 70 в 2013 г., ♀Сага × ♂Скэнт 3 в 2014 г.).

На экспериментальном участке Вальдорфской школы распространенность пятнистостей в 2013 г. изменялась у гибридов от 3 (♀Сага × ♂Лютесценс 70) до 15 % (♀Сага × ♂Скэнт 3), у сортов от 2 (Ashby) до 15 % (Scirocco); в 2014 г. – у гибридов от 0 (♀Hybrid × ♂Лютесценс 70, ♀Сага × ♂Скэнт 3) до 10 % (♀Сага × ♂Лютесценс 70), а у стандартных сортов показатель не превышал 10 %. При этом гибридные комбинации ♀Сага × ♂Скэнт 1 и ♀Сага × ♂Лютесценс 70 в оба года исследований на экспериментальном участке в Земле Баден-Вюртемберг характеризовались очень высокой устойчивостью ($R_{2013} = 5\%$, $R_{2014} = 5\%$ и $R_{2013} = 10\%$, $R_{2014} = 5\%$ соответственно). На опытной станции Waldhof признаков поражения растений пятнистостями в оба вегетационных периода не отмечено (рис. 2).

Идентификация возбудителей листовых пятнистостей в лабораторных условиях на растительном материале из микологического гербария методом влажной камеры показала, что в обоих пунктах исследований (экспериментальные участки биостанции «Озеро Кучак» и Вальдорфской школы) возбудителями являлись *Alternaria* spp. и *Helminthosporium* spp. Особенно подвержены заболеванию ослабленные растения (Hoffmann, Schmutterer, 1999). Следует отметить, что значительная распространенность патогенов зарегистрирована на листьях сортов немецкой селекции (Ashby и Granus) в 2014 г. на экспериментальном участке биостанции «Озеро Кучак». Возможно, повышенная восприимчивость растений к заболеванию связана с благоприятными для патогенов погодными условиями вегетационного периода и генотипическими особенностями сортов.

Максимальная распространенность бурой листовой ржавчины наблюдалась на посевах биостанции «Озеро Кучак» в 2014 г. Как у гибридов (F_5), так и у сортов данный показатель варьировал от 10 (♀Сага × ♂Лютесценс 70, ♀Hybrid × ♂Лютесценс 70; Ashby) до 100 % (♀Сага × ♂Скэнт 3; Новосибирская 15, Иргина, Granus). Индекс развития болезни изменялся от 5 (♀Сага × ♂Лютесценс 70, ♀Hybrid × ♂Лютесценс 70; Granus, Eminent) до 25 % (♀Сага × ♂Скэнт 3; Иргина). Причиной высокой активности патогена в вегетационный период 2014 г. мог стать недостаток влаги в июне (46,4 % относительно нормы), что значительно ослабило ювенильные растения пшеницы, но способствовало лучшему распространению уредоспор.

В многолетних (2001–2012 гг.) испытаниях Т.С. Маркеловой с соавторами (2013) при изучении биологических особенностей бурой ржавчины пшеницы в Нижнем По-

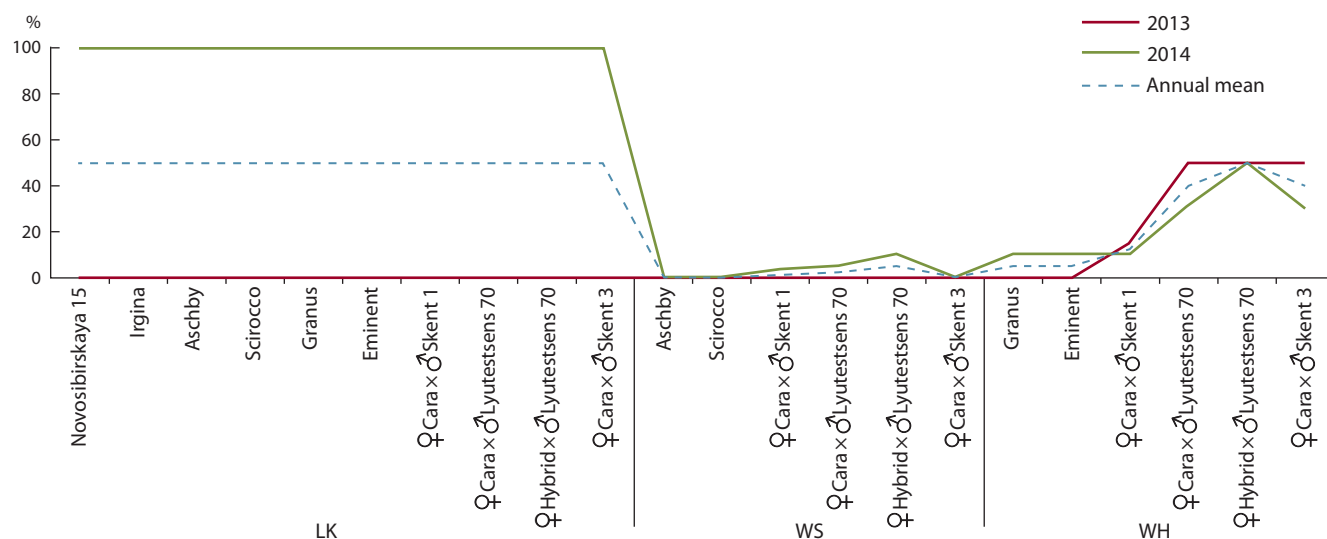


Fig 1. Prevalence (%) of powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Em. Marchal) on leaves of hybrid (F_4 , F_5) forms and cultivars of soft spring wheat under different ecological and geographical conditions.

Hereafter: LK, Lake Kuchak biological research station; WS, experimental site of the Waldorf school; WH, Waldhof experimental station.

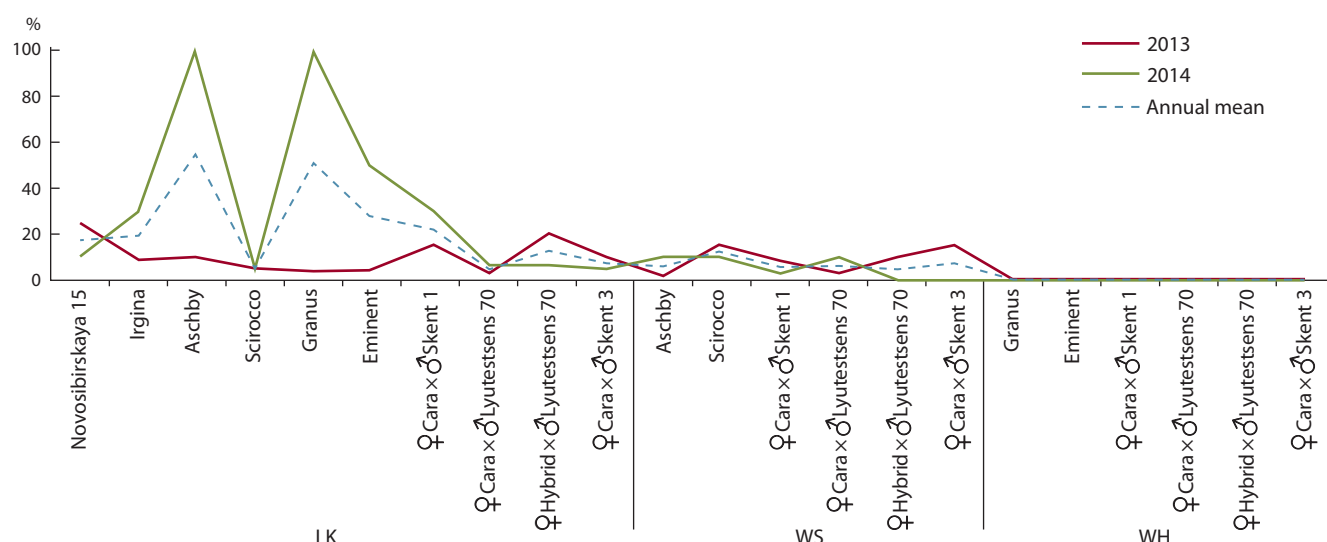


Fig. 2. Prevalence (%) of spot blotch of wheat (*Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp.) on leaves of hybrid (F_4 , F_5) forms and cultivars of soft spring wheat under different ecological and geographical conditions.

вожже в засушливом 2010 г. также была отмечена 100 % пораженность весенних посевов озимой пшеницы в июле–августе. По мнению Э. Гоймана (1954) и Н.А. Черемисинова (1973), в сухую и ветреную погоду распространение спор фитопатогенных грибов происходит более интенсивно, чем в дождливую. Прорастание спор фитопатогенных грибов в таких условиях возможно за счет различной гигроскопичности субстрата и кутикулярной, а также устьичной транспирации, вследствие чего плотность пара в прилегающем к листьям слое воздуха несколько выше, чем в окружающем пространстве (Гойман, 1954).

В Германии за время исследований зарегистрирована незначительная пораженность растений пшеницы бурой листовой ржавчиной. В среднем за два года на экспериментальном участке Вальдорфской школы распростра-

ненность этого патогена у гибридов не превышала 3 % (♀ Cara × ♂ Скент 3), у сорта Scirocco – 2,5 %. На опытном участке Waldhof данный показатель у гибридных комбинаций не превышал 9 % (♀ Cara × ♂ Лютесценс 70), у стандартов – 2,5 % (рис. 3). В обоих пунктах гибриды характеризовались высокой и очень высокой устойчивостью ($R_{2013-2014} = 0-25$ %).

Различная реакция гибридных форм и сортов по отношению к рассмотренным фитопатогенным грибам в контрастных природно-климатических условиях объясняется особенностями абиотических факторов и генотипа исследуемого материала.

По мнению Н.Г. Ведрова (1984), более комплексным показателем устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам в течение всего периода онто-

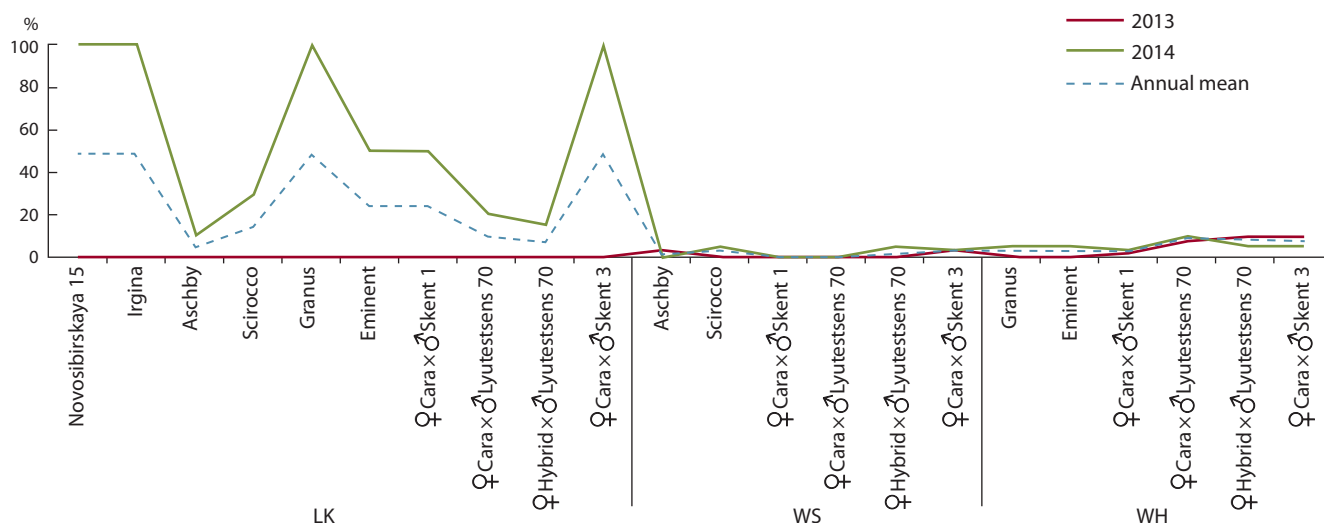


Fig. 3. Prevalence (%) of brown rust (*Puccinia recondita* Rob. ex. Desm. f. sp. *tritici* Eriks. (= *P. triticina* Eriks.)) on leaves of hybrid (F₄, F₅) forms and cultivars of soft spring wheat under different ecological and geographical conditions.

генеза является выживаемость растений, рассчитанная как отношение сохранившихся к уборке растений к высеянному семенам. В работе Ю.Л. Гужова с соавторами (1999) этот показатель рассматривается как биологическая устойчивость растений, в работе В.Т. Васью (2004) – как коэффициент адаптации. По нашим данным, в среднем за 2013–2014 гг. в географических пунктах исследований доля растений, сохранившихся к концу вегетационного периода, у гибридов изменялась в широких пределах: от 31,0 (♀Сага × ♂Скэнт 1 – экспериментальный участок Вальдорфской школы) до 73,8 % (♀Сага × ♂Лютеценс 70 – опытная станция Waldhof). Для гибрида ♀Сага × ♂Лютеценс 70 отмечена в пунктах Германии и России относительно высокая выживаемость растений. Достоверной корреляции пораженности идентифицированными фитопатогенными грибами с выживаемостью растений не выявлено.

Заклучение

Анализ устойчивости гибридных форм (F₄ и F₅) к основным фитопатогенным грибам в контрастных эколого-географических условиях позволил выделить гибриды с высокой устойчивостью:

- к мучнистой росе (*E. graminis* DC.) – ♀Сага × ♂Скэнт 1 и ♀Сага × ♂Лютеценс 70;
- к пятнистостям (*Alternaria* spp. и *Helminthosporium* spp.) – ♀Сага × ♂Скэнт 1, ♀Сага × ♂Лютеценс 70, ♀Гибрид × ♂Лютеценс 70 и ♀Сага × ♂Скэнт 3;
- к бурой листовой ржавчине (*P. recondita* Rob. ex. Desm. f. sp. *tritici* Eriks. (= *P. triticina* Eriks.)) – ♀Сага × ♂Скэнт 1, ♀Сага × ♂Лютеценс 70, ♀Гибрид × ♂Лютеценс 70 и ♀Сага × ♂Скэнт 3;
- к комплексному воздействию патогенов – ♀Сага × ♂Скэнт 1 и ♀Сага × ♂Лютеценс 70.

В результате расширенного экологического испытания была выделена гибридная комбинация ♀Сага × ♂Лютеценс 70, характеризовавшаяся низкой восприимчивостью ко всем идентифицированным фитопатогенным грибам

и относительно высоким коэффициентам адаптации в двух географических пунктах Германии (экспериментальный участок Вальдорфской школы и опытная станция Waldhof).

Полученные гибридные формы являются ценным материалом для адаптивной селекции мягкой яровой пшеницы.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Belov N.F., Smirnova I.A. Metodicheskie ukazaniya po discipline «Prikladnaya meteorologiya – optimizacija upravljajushhih reshenij» dlja vysshih uchebnyh zavedenij [Methodical guidelines for the course “Applied Meteorology – Optimization of Managing Decisions” for higher educational institutions]. Saint Petersburg, Publishing Russian State Hydrometeorological University, 2006. (in Russian)
- Bogoslovsky S.N. Stages of technologically complete “production-realization” chain for wheat grain. Nauchnyy zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU. 2008;37(3):71-92. (in Russian)
- Bome N.A., Ripberger E.I., Trautz D. Variability of productivity indices of the spike of *Triticum aestivum* L. hybrid forms as the way of adaptation to various ecological and geographical conditions. Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Ecologia i prirodopolzovanie = Tyumen State University Herald. Natural resource use and ecology. 2015;1(1):98-106. (in Russian)
- Cheremisinov N.A. Obschaya patologiya rasteniy [General Pathology of Plants]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1973. (in Russian)
- Dorofeev V.F., Laptev Ja.P., Chekalin N.M. Tsvetenie, opylenie i gibridizatsiya rasteniy [Flowering, Pollination, and Hybridization of Plants]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1990. (in Russian)
- Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki issledovaniy) [Technique of the Field Experiment (with Fundamentals of the Statistical Evaluation of Results)]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)
- Govorova G.F. Metody otsenki selskokhozyaystvennykh kultur pri selektsii na immunitet [Methods of Crop Assessment in Breeding for Immunity]. Moscow, RGAU-MSKhA Publ., 2011. (in Russian)
- Goyman E. Infektsionnye bolezni rasteniy [Infectious Diseases of Plants]. Moscow, Izdatelstvo inostrannoy literatury Publ., 1954. (in Russian)

- Gradchaninova O.D., Filatenko A.A., Rudenko M.I. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu mirovoy kolleksii pshenitsy [Methodical Guidelines for Studying the World Collection of Wheat]. Leningrad, VIR Publ., 1987. (in Russian)
- Griffing B.A. A generalized treatment of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity*. 1956a;10:31-50.
- Griffing B.A. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austr. J. Biol. Sci.* 1956b;9(4):463-493.
- Gritsenko V.V., Orekhov D.A., Popov S.Ya., Stroykov Yu.M., Tretyakov N.N., Shkalikov V.A. Zashchita rasteniy [Protection of Plants]. Moscow, Mir Publ., 2005. (in Russian)
- Gulyaeva E.I. Modern research of the wheat leaf rust agent in the Laboratory of Mycology and Plant Pathology, All-Russia Research Institute of Plant Protection. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii "Problemy mikologii i fitopatologii v XXI veke" [Proc. Int. Sci. Conf. "Problems of mycology and plant pathology in the XXI century"]. Saint-Petersburg, 2013;67-69. (in Russian)
- Guzhov Yu.L., Fuks A., Valichek P. Seleksiya i semenovodstvo kulturnykh rasteniy [Crop Breeding and Seed Farming]. Moscow, RUDN Publ., 1999. (in Russian)
- Hoffmann G.M., Schmutterer H. Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Stuttgart: Ulmer, 1999.
- Kilchevskiy A.V., Khotyleva L.V. (Sci. Eds.) Geneticheskie osnovy seleksii rasteniy. Nauch. red. A.V. Kilchevskiy, L.V. Khotyleva [Genetic Bases of Plant Breeding]. Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2008. (in Russian)
- Koles O.E., Lozhkina N.S., Prokuratova A.S., Kalinenko N.A. Development of leaf diseases in grain crops at prolonged use of chemicals in the southern forest steppe of West Siberia. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental research*. 2006;8:66-67. (in Russian)
- Makarova M.A. Phytopathological evaluation of resistance to fungal diseases in grain crops grown in the middle reaches of the Amur. *Dalnevostochnyy agrarnyy vestnik = Far East Agrarian Bulletin*. 2012;3:75-78. (in Russian)
- Markelova T.S., Ivanova O.V., Naryshkina E.A., Baukenova E.A. Biological features of brown rust of wheat in the Lower Volga region and the structure of population. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii "Problemy mikologii i fitopatologii v XXI veke" [Proc. Int. Sci. Conf. "Problems of mycology and plant pathology in the XXI century"]. Saint-Petersburg, 2013;177-179. (in Russian)
- Mebrate S.A., Dehne H.W., Pillen K., Oerke E.C. Postulation of seedling leaf rust resistance genes in selected Ethiopian and German bread wheat cultivars. *Crop Science*. 2008;48:507-516. DOI 10.2135/cropsci2007.03.0173.
- Metody eksperimentalnoy mikologii [Methods of Experimental Mycology]. Kiev: Naukova dumka Publ., 1982. (in Russian)
- Mezhdunarodnyy klassifikator SEV roda *Triticum* L. [CMEA International Classification Code of the *Triticum* L. Genus]. Leningrad, VIR Publ., 1984. (in Russian)
- Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. *Phytopathology*. 2012;12:560-566.
- Nuriyeva S.A., Isayev B.G. Phytopathological evaluation of the resistance to fungal diseases in bread wheat (*Triticum aestivum*) varieties in Azerbaijan. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii "Problemy mikologii i fitopatologii v XXI veke" [Proc. Int. Sci. Conf. "Problems of mycology and plant pathology in the XXI century"]. Saint-Petersburg, 2013;198-199. (in Russian)
- Pavlyushin V.A. Management strategies in crop protection. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii "Problemy mikologii i fitopatologii v XXI veke" [Proc. Int. Sci. Conf. "Problems of mycology and plant pathology in the XXI century"]. Saint-Petersburg, 2013;202-205. (in Russian)
- Phillips S., Norton R. Global wheat production and fertilizer user. *Better Crops*. 2012;96(3):4-6.
- Pogoda i klimat [Weather and climate]. Available at: <http://www.pogodaiklimat.ru/monitor.php> (accessed October 4, 2014). (in Russian)
- Popkova K.V., Shkalikov V.A., Stroykov Yu.M., Lekomtseva S.N., Skvortsova I.N. Obshchaya fitopatologiya [General Plant Pathology]. Moscow, Drofa Publ., 2005. (in Russian)
- Proplanta. Das Informationszentrum für die Landwirtschaft. Available at <http://www.proplanta.de/Agrar-Wetter/Deutschland/> (accessed 10 October 2014).
- Ripberger E.I., Bome N.A., Trautz D. Study of the germination capacity of seeds of hybrids of soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) under various ecological and geographical conditions. *V mire nauchnykh otkrytiy = In the World of Scientific Discoveries*. 2014;8(56):148-168. (in Russian)
- Ripberger E.I., Bome N.A., Trautz D. Variability of plant height in hybrid forms of spring common wheat (*Triticum aestivum* L.) under different ecological and geographical conditions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(2):185-190. (in Russian)
- Sochalova L.P., Likhenko I.E. The gene pool of the sources of resistance of the spring wheat to the leaf diseases. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2013;6:3-6. (in Russian)
- Umweltanalytische Produkte GmbH. Available at <http://www.upgmbh-logstar.de/> (accessed 10 October 2014).
- Vasko V.T. Teoreticheskie osnovy rastenievodstva [Theoretical Fundamentals of Plant Growing]. Saint-Petersburg, PROFI-INFORM Publ., 2004. (in Russian)
- Vavilov N.I. Immunity of plants to infectious diseases. *Izvestiya Petrovskoy selskokhozyaystvennoy akademii = Bulletin of the Petrovsk Agricultural Academy*. 1918. (in Russian)
- Vedrov N.G. Seleksiya i semenovodstvo yarovoy pshenitsy v ekstremalnykh usloviyakh [Breeding and seed farming of spring wheat under extreme conditions]. Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State University Publ., 1984. (in Russian)

Метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса (*Avena* L.)

И.Г. Лоскутов^{1, 2}✉, Т.В. Шеленга¹, А.В. Конарев¹, А.А. Шаварда^{1, 2, 3}, Е.В. Блинова¹, Н.И. Дзюбенко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

Исследовались метаболомные спектры зерновок диких и культивируемых форм (сортов) овса (*Avena* L.). Материалом для изучения служили образцы семян из коллекции ВИР. Метаболомные исследования (анализ метаболома) проводили методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ГЖХ-МС) на хроматографе Agilent 6850 (США). Анализировали состав и содержание органических и жирных кислот, аминокислот, многоатомных спиртов и сахаров. Установлено, что у сортов по сравнению с дикими видами сузился (в ряде случаев существенно) диапазон колебания значений содержания изученных групп соединений. Наряду с резким увеличением содержания олеиновой кислоты у сортов снизилось содержание линолевой кислоты. В целом сравнение метаболомных спектров зерновок диких видов и сортов позволило сделать следующие основные выводы. Ряд дикорастущих видов овса может быть рекомендован в качестве потенциального источника биохимических признаков качества при селекции. Выявлены метаболиты, содержание которых меняется в процессе окультуривания или по которым дикие виды овса отличаются от сортов этой культуры. Среди этих соединений наряду с такими широко известными составляющими здорового питания, как олеиновая кислота, глюкоза, фруктоза и др., выявлены моноацил-глицеролы – MAG 16:0, MAG-2 18:2 и др. Высказано предположение, что последние могут быть связаны с формированием признаков адаптивности, в частности с устойчивостью к болезням и вредителям, абиотическим факторам среды.

Ключевые слова: *Avena* L.; дикие виды; сорта; зерновки; газовая хроматография; масс-спектрометрия; метаболомика; окультуривание; адаптивность и полиморфизм признаков.

The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena* L.)

I.G. Loskutov^{1, 2}✉, T.V. Shelenga¹, A.V. Konarev¹, A.A. Shavarda^{1, 2, 3}, E.V. Blinova¹, N.I. Dzubenko¹

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

² St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, Russia

³ V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia

Seed metabolomic profiles have been investigated in wild and cultivated forms (cultivars) of oat (*Avena* L.). Seed accessions from the VIR oat collection were used for the research. Metabolomic analysis employed gas liquid chromatography-mass spectrometry (GLC-MS) using an Agilent 6850 chromatographer (USA). The analysis covered the composition and content of organic and fatty acids, amino acids, polyatomic spirits and sugars. The content fluctuation range for the studied groups of compounds was found to be narrower (significantly in some cases) in cultivars than in the wild species. Along with a sharp increase in oleic acid content, cultivars demonstrated a decrease in that of linoleic acid. The general conclusions from the comparison of seed metabolomic profiles in wild species and cultivars are presented below. A number of wild species can be recommended as a potential source of biochemical quality traits for breeding purposes. A series of metabolites (compounds), the content of which changes during domestication or which differentiate wild oat species from cultivars has been identified was found. Along with such well-known healthy food chemical factors as oleic acid, glucose and fructose, etc., differences concerning monoacylglycerol compounds (MAG 16:0 and MAG-2 18:2, etc.) have been found. The latter have been proposed to be related to the formation of adaptive traits, in particular, resistance to diseases and pests, and to environmental abiotic stresses.

Key words: *Avena* L.; wild species; varieties, seeds; gas chromatography; mass spectrometry; metabolomics; amelioration; adaptability and polymorphism of characters.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В., Шаварда А.А., Блинова Е.В., Дзюбенко Н.И. Метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса (*Avena* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):636-642. DOI 10.18699/VJ16.185

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V., Shavarda A.A., Blinova E.V., Dzubenko N.I. The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena* L.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):636-642. DOI 10.18699/VJ16.185

ORIGINAL ARTICLE

Received 27.05.2016

Accepted for publication 06.06.2016

© AUTHORS, 2016

Селекционная ценность исходного материала определяется характеристиками, обеспечивающими устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды, питательные, кормовые и технологические качества будущих сортов. Основным селекционным приоритетом при создании сортов овса посевного (*Avena sativa* L.) до не давнего времени являлась урожайность. Требования к качеству сводились, как правило, к оценке наиболее общих биохимических признаков, таких как содержание белка, лизина и крахмала, и некоторых технологических характеристик. Одновременно разрабатывалась концепция здорового питания, успех которой напрямую зависел от уровня фундаментальных знаний о метаболитах и метаболических процессах, происходящих в организме человека, с одной стороны, и веществах, получаемых из растительной пищи, с другой.

Важнейшими биохимическими признаками культурных растений, характеризующими их ценные пищевые и медико-биологические свойства, являются вторичные метаболиты растений и основные вещества первичного метаболизма – полисахариды, белки, липиды. В этом аспекте задача сохранения и устойчивого использования генетических ресурсов растений в формировании высокого качества жизни людей, основу которого составляет качество питания, с каждым десятилетием становится все более актуальной. Для оценки содержания известных и поиска новых биологически активных соединений необходим скрининг генетических ресурсов растений. Логичное следствие этих процессов – селекция на данные признаки, что в свою очередь потребовало разработки методических подходов к анализу таких соединений в исходном и селекционном материале, а также в конечной продукции, получаемой при возделывании созданных сортов. Поэтому закономерным было прозвучавшее в 2002 г. на XXVI Международном конгрессе (XXVI International Horticultural Congress: Horticulture, Art and Science for Life, Toronto, Canada) заявление: «В 20-м веке селекционеры достигли успехов в селекции на урожайность. 21-й век будет веком селекции на биологически активные вещества (БАВ)».

Вторичные метаболиты растений, являющиеся носителями фармакологических и токсических свойств, предшественниками мутагенных, тератогенных соединений, веществ, оказывают существенное влияние на развитие микрофлоры кишечника. Выделено 11 групп неалиментарных веществ, для которых экспериментально доказан их определенный фармакологический эффект (пищевые волокна, олигосахариды, полифункциональные спирты, фенольные соединения, терпены и терпеноиды, фосфолипиды, гликозиды, витамины и др.) (Красильников, 2015).

Следует сказать, что во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) актуальность и важность биохимических исследований БАВ понимали еще в довоенные годы (30-е годы прошлого столетия). Соратник Н.И. Вавилова, основатель биохимии культурных растений как научного направления проф. Н.Н. Иванов уделял большое внимание изучению БАВ (витаминов, веществ вторичного происхождения – фенольных соединений, гликозидов, эфирных масел, алкалоидов и др.) в коллекциях мировых генетических

ресурсов (Конарев, Ярош, 2015). Исследования эти были продолжены в ВИР и в последующие годы (Ермаков и др., 1969; Методы..., 1987; Конарев, Хорева, 2000). Результаты биохимического скрининга мировой коллекции не потеряли своего значения до настоящего времени. Более того, они послужили основой при организации ряда международных проектов, посвященных проблемам функционального питания.

В последние годы особую важность в физиологических исследованиях приобрел новый методический подход, основанный на самом полном описании профиля из метаболитов объекта и их количественном определении. Метаболомный подход используется для решения все более широкого круга задач, включая такую актуальную для ВИР задачу, как «оценка сортовой специфичности семян» (Смоликова и др., 2015). Согласно современным представлениям, метаболитный профиль есть суммарный результат деятельности клетки на молекулярно-генетическом и биохимическом уровнях. Анализ метаболомных профилей позволяет идентифицировать определенное число биохимических маркеров биологических процессов. Методической основой современных исследований вышеупомянутых соединений являются газожидкостная и жидкостная (высокого давления) хроматографии, особенно эффективные в сочетании с масс-спектрометрией (Лохов, Арчаков, 2008; Shulaev et al., 2008).

Одна из задач метаболомики – изучение ответной реакции организма на воздействие окружающей среды. В результате любого воздействия на организм происходят множественные изменения концентраций различных метаболитов с целью поддержания гомеостаза. В норме внутриклеточные метаболиты находятся в динамическом равновесии с метаболитами окружающей среды. Анализируя полученные метаболитические профили, можно получить своеобразный «отпечаток» (fingerprint), отражающий физиологическое состояние организма (Ситкин и др., 2013).

Надо сказать, что выяснением роли отдельных веществ в формировании устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды в ВИР занимались и ранее. Этому вопросу были посвящены исследования роли алкалоидов эндофитных грибов в устойчивости кормовых злаковых трав к насекомым-вредителям и в зимостойкости (Шеленга и др., 2006).

Овес посевной (*Avena sativa* L.) – одна из самых перспективных и востребованных в настоящее время сельскохозяйственных культур, поскольку обладает рядом ценных свойств, отвечающих требованиям, предъявляемым к продуктам «функционального питания», и позволяющих использовать его в кормовых и медико-профилактических целях (Лоскутов, 2007; Leonova et al., 2008; Loskutov, Rines, 2011). Овсяное зерно отличают белки, лучше сбалансированные по аминокислотному составу в сравнении с белками других зерновых, в частности имеющие повышенное содержание незаменимых аминокислот (аргинина, гистидина, лизина, триптофана) (Лоскутов, 2007; Конарев и др., 2015). Показана важная роль овса как заменителя пшеницы для организации безглютенового питания лиц, страдающих непереносимостью пшеничных белков или целиакией (Алпатьева и др., 2004).

При создании сортов овса (и не только), конкурентных на рынке по питательным, кормовым и технологическим качествам, основные методические трудности связаны с приданием этим сортам одновременно также устойчивости к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды. В отличие от предыдущей публикации (Конарев и др., 2015), в данной работе мы сосредоточим внимание на сравнительном метаболомном анализе изменений, происходящих в процессе селекции при окультуривании.

Известно, что неисчерпаемым источником ценных для вновь создаваемых сортов признаков служат дикие родичи, а также представители близких видов. В ВИР сосредоточена богатая коллекция диких видов овса, которая изучалась на протяжении ряда лет, в том числе по так называемым основным биохимическим признакам качества, устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды и др. (Конарев, Хорева, 2000; Лоскутов, 2007; Leonova et al., 2008; Loskutov, Rines, 2011; Конарев и др., 2015). Метаболомные исследования диких видов овса, в том числе в сравнении с культивируемыми формами, в таком объеме, насколько нам известно, нигде не проводились.

Изменения, происходящие в процессе селекционной работы с исходным и селекционным материалом, – предмет интереса не только селекционеров, но и специалистов смежных дисциплин, генетиков, морфологов, биохимиков, физиологов, диетологов и др. (Perkowski et al., 2012; Gu et al., 2015; Sánchez-Martín et al., 2015). Во всех случаях прослеживается как практический, так и теоретический аспект этого вопроса.

Метаболомный подход с его охватом широкого круга соединений может дать информацию для более глубокого понимания процессов окультуривания форм или селекции уже на уровне метаболических процессов в целом, а не только связанных с отдельными соединениями «интереса». И поставленная в настоящем исследовании задача – лишь первый этап на пути понимания механизмов (в частности, биохимических и на уровне метаболома), обеспечивающих устойчивость сортов к болезням и вредителям, прочим стрессам.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили образцы зерна диких и культурных видов овса, выращенных в Пушкинском филиале ВИР в 2015 г. (табл. 1 и 2).

Исследования проводили на зерновках 12 образцов диких видов овса разного уровня ploидности ($2n = 14, 28, 42$) и 10 образцов отечественных и зарубежных пшеничатых и голозерных сортов овса посевного ($2n = 42$), представляющих наиболее важные и распространенные селекционные группы из коллекции отдела генетических ресурсов ржи, ячменя и овса ВИР им. Н.И. Вавилова.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом. Несколько зерен образца взвешивали, гомогенизировали с адекватным количеством этанола, пробу настаивали в течение 30 дней при 5–6 °С. Полученные 100 мкл экстракта выпаривали досуха на установке CentriVap Concentrator фирмы Labconco (США). Сухой остаток силилировали с помощью бис(триметилсилил)трифторацетамидом в течение 40 мин при 100 °С. Качественное и коли-

чественное определение биохимического состава зерна проводили на капиллярной колонке HP-5MS (5 % фенил) метилполисилоксан (30 м, 250 мкм, 0,25 мкм) с помощью газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ГЖХ-МС) на хроматографе Agilent 6850 с квадрупольным масс-селективным детектором Agilent 5975B VL MSD фирмы Agilent Technologies (США). Условия проведения хроматографического исследования: скорость потока инертного газа через колонку 1,5 мл/мин. Программа нагревания колонки: начальная температура +70 °С, конечная – +220 °С, скорость нагревания 4,0 °С в минуту. Температура детектора масс-спектрометра +250 °С, температура инжектора +300 °С, объем вводимой пробы 1 мкл.

Внутренним стандартом служил раствор трикозана в пиридине (1 мкг/мкл). Полученные результаты обрабатывались с помощью программы UniChrom (Шеленга и др., 2014; Смоликова и др., 2015).

Результаты

В результате экспериментов были получены данные по составу метаболитов зерновок диких видов и сортов овса: состав и содержание органических и жирных кислот, аминокислот, многоатомных спиртов, а также сахаров – дисахаров и моносахаров (в мг на 100 г сырого веса). Среди органических кислот высоким содержанием в зерновках диких видов овса характеризуются яблочная (разброс значений от 10 до 113 мг/100 г), глюконовая и галактурононовая кислоты; прочие присутствуют в малом количестве или на уровне следов. Среди жирных кислот высоким содержанием отличаются пальмитиновая (до 250 мг/100 г и выше) и вакценовая (до 600 мг/100 г и выше) кислоты, а также линолевая. При этом различия между видами по перечисленным показателям могут быть значительными: например, для линолевой и линоленовой кислот – от 50 до 300 мг/100 г. Наиболее существенны различия для вакценовой кислоты: минимальное значение 70 мг/100 г, максимальное – 643 мг/100 г. Линолевая и линоленовая кислоты – ценные для питания человека омега-6 и -3 жирные кислоты.

Среди изученных образцов по показателям качества выделяется гексаплоидный дикий вид *A. occidentalis*. У него найдено исключительно высокое содержание вакценовой (643 мг/100 г), линолевой (309 мг/100 г) и линоленовой (258 мг/100 г) кислот и самое высокое среди изученных диких видов содержание арахидиновой кислоты – 11 мг/100 г (табл. 3). Кроме того, в этом виде обнаружено уникально высокое содержание моноацилглицерола – МАГ-2 (18:2) – 695 мг/100 г.

Повышенное содержание пальмитиновой (261 мг/100 г), стеариновой (23 мг/100 г) и линолевой (374 мг/100 г) жирных кислот найдено у диплоидного вида *A. clauda* и тетраплоидного вида *A. agadiriana* (200; 25 и 351 мг/100 г соответственно). Образцы *A. occidentalis* имели повышенное содержание ситостерола (27 мг/100 г), что говорит о большей стабильности жирных кислот в зерновках этого вида. Повышенным содержанием ситостерола также отличались образцы *A. agadiriana* (20 мг/100 г) и *A. sterilis* (29 мг/100 г). Таким образом, *A. occidentalis*, обладая повышенным содержанием жирных кислот и ситостеролов, может быть хорошим источником для

Table 1. Wild oat (*Avena* L.) species analyzed in the study

Accession no. in the VIR collection	Species	Accession	Origin	Ploidy (2n = 14)
2108	<i>A. atlantica</i> Baum et Fedak	CN 25849	Morocco	2n
293	<i>A. canariensis</i> Baum	CA 70	Spain	2n
1907	<i>A. clauda</i> Durie.	ME 0046	Turkey	2n
1810	<i>A. hirtula</i> Lagas.	Ave 0519/83	Morocco	2n
2119	<i>A. wiestii</i> Steud.	CN 24322	Israel	2n
2122	<i>A. agadiriana</i> Baum et Fedak	CN 25837	Morocco	4n
2102	<i>A. insularis</i> Ladiz.	TMP 2007	Italy	4n
2099	<i>A. magna</i> Murph. et Terr.	EN 2693	Morocco	4n
77	<i>A. fatua</i> L.		China	6n
428	<i>A. ludoviciana</i> Durie.	ME 1084	Iran	6n
1967	<i>A. occidentalis</i> Durie.	CA 38	Spain	6n
655	<i>A. sterilis</i> L.	CAV 1975	Algeria	6n

Table 2. Common oat (*Avena sativa* L.) varieties analyzed in the study

Accession no. in the VIR collection	Variety	Origin
11840	Borrus	Germany
14648	Argamak	Russia, Kirov region
14851	Numbat*	Australia
14911	Belinda	Sweden
14960	Vyatskiy*	Russia, Kirov region
15305	Gehl*	Canada
15327	KCI 731/01	Russia, Ul'yanovsk region
15348	Hurdal	Norway
15442	Zalp	Russia, Moscow region
15444	Sapsan	Russia, Kirov region

* Hulless oat varieties.

Table 3. Total contents of major classes of biomolecules in grains of common oat accession, mg/100 g

Variety	Organic acids	Fatty acids	Amino acids	Polyols	Sterols	Monosaccharides	Disaccharides
Borrus	45.6±0.02	600.4±0.12	57.1±0.03	105.3±0.05	6.9±0.00	925.5±0.09	1573.6±0.06
Argamak	45.8±0.02	405.1±0.08	76.8±0.04	193.1±0.10	12.3±0.01	700.1±0.07	2400.1±0.10
Numbat*	57.6±0.03	532.0±0.11	88.0±0.04	189.8±0.09	10.3±0.01	589.4±0.06	2303.9±0.09
Belinda	48.1±0.02	511.3±0.10	44.7±0.02	172.4±0.09	19.4±0.01	721.6±0.07	2391.7±0.10
Vyatskiy*	49.0±0.02	590.3±0.12	112.2±0.06	241.9±0.12	16.5±0.01	1477.0±0.15	2175.7±0.09
Gehl*	52.1±0.03	514.5±0.10	88.3±0.04	267.5±0.13	15.9±0.01	1458.5±0.15	1112.1±0.04
KCI 731/01	46.8±0.02	439.8±0.09	85.7±0.04	190.5±0.10	16.3±0.01	700.1±0.07	2357.7±0.09
Hurdal	38.3±0.02	416.3±0.08	41.6±0.02	159.4±0.08	15.1±0.01	792.8±0.08	3254.3±0.13
Zalp	46.5±0.02	452.6±0.09	76.5±0.04	209.2±0.10	29.1±0.01	896.8±0.09	3265.1±0.13
Sapsan	68.8±0.03	477.7±0.10	87.1±0.04	169.5±0.08	22.0±0.01	738.7±0.07	2779.7±0.11

Note: Here and in Tables 4 and 5 differences are significant at $p < 0.05$.

* Hulless oat varieties.

Table 4. Total contents of biomolecules in grains of wild oat species, mg/100 g

Species	Organic acids	Fatty acids	Amino acids	Polyols	Sterols	Monosaccharides	Disaccharides	Total sugar
<i>A. atlantica</i>	116.5±0.06	275.3±0.03	54.4±0.03	507.5±0.15	0.0±0.00	1179.8±0.10	541.7±0.01	1721.4±0.04
<i>A. canariensis</i>	67.3±0.03	705.1±0.07	22.6±0.01	278.7±0.08	19.9±0.01	1752.2±0.06	4601.5±0.09	6353.7±0.07
<i>A. clauda</i>	99.6±0.05	1058.8±0.11	61.3±0.03	370.3±0.11	7.4±0.00	1194.6±0.08	6943.7±0.14	8138.3±0.10
<i>A. hirtula</i>	159.2±0.08	1000.3±0.10	50.6±0.03	338.2±0.10	23.3±0.01	1005.9±0.07	3450.3±0.07	4456.3±0.06
<i>A. wiestii</i>	163.2±0.08	433.6±0.04	142.2±0.07	248.5±0.07	11.0±0.01	698.4±0.05	379.0±0.01	1077.3±0.02
<i>A. agadiriana</i>	167.4±0.08	1040.6±0.10	45.8±0.02	342.4±0.10	25.0±0.01	1429.5±0.07	1588.0±0.03	3017.5±0.04
<i>A. insularis</i>	115.7±0.06	656.1±0.07	41.1±0.02	171.3±0.05	25.7±0.01	329.8±0.04	7424.2±0.15	7754.1±0.09
<i>A. magna</i>	37.1±0.02	412.0±0.04	19.3±0.01	91.7±0.03	13.5±0.01	358.3±0.02	4979.1±0.10	5337.4±0.06
<i>A. fatua</i>	71.5±0.04	725.5±0.07	27.8±0.01	239.4±0.07	29.5±0.01	1971.4±0.06	859.5±0.02	2830.9±0.03
<i>A. ludoviciana</i>	51.6±0.03	548.0±0.05	15.2±0.01	188.1±0.06	13.3±0.01	764.3±0.04	752.0±0.02	1516.3±0.02
<i>A. occidentalis</i>	171.0±0.09	1633.4±0.16	41.7±0.02	445.8±0.13	30.3±0.02	1013.9±0.10	1665.3±0.03	2679.3±0.05
<i>A. sterilis</i>	141.0±0.07	1019.1±0.10	36.9±0.02	375.2±0.11	32.6±0.02	1119.9±0.08	2516.7±0.05	3636.6±0.06

селекции овса на повышенную масличность и стабильность масла. Повышенным содержанием по большинству аминокислот выделялся диплоидный вид *A. wiestii*; также повышенное содержание отдельных аминокислот имели тетраплоидный вид *A. agadiriana* и гексаплоидные виды *A. ludoviciana* и *A. occidentalis*.

Фруктозу и глюкозу можно отнести к компонентам здорового питания, чего не скажешь о сахарозе, содержание которой в большинстве случаев в десятки раз превышает содержание всех моносахаров. Примечательно, что у всех гексаплоидных видов содержание моносахаров в зерновке выше, чем сахарозы (табл. 4). Содержание ди- и полисахаров у образцов диплоидного вида *A. clauda* (6943 и 8138 мг/100 г) и тетраплоидного вида *A. insularis* (7424 и 7754 мг/100 г) в несколько раз превышало этот показатель у других изученных образцов диких видов овса. Особого внимания заслуживают гексаплоидные виды *A. fatua* и *A. ludoviciana* с низким содержанием сахарозы в зерновке и высоким – моносахаров.

При рассмотрении суммарных биохимических показателей зерновки диких видов овса установлены различия по группам с разным уровнем пloidности. У диплоидных видов была наибольшая сумма аминокислот, многоатомных спиртов, моно- и полисахаров, у тетраплоидных – наибольшая сумма органических кислот и дисахаров, у гексаплоидных – незначительно большее содержание жиросодержащих веществ – жирных кислот и стеролов (см. табл. 4). Кроме того, у диплоидов и тетраплоидов содержание ди- и полисахаров в два раза выше, чем у гексаплоидных видов (см. табл. 4).

Среди органических кислот высоким содержанием у образцов посевного овса выделяются яблочная (разброс значений от 11 до 43 мг/100 г, что меньше, чем у диких видов), глюконовая и галактуроновая кислоты. Среди жирных кислот высоким содержанием характеризуются пальмитиновая (до 200 мг/100 г) и олеино-

вая (до 215 мг/100 г) кислоты, а также линолевая (до 182 мг/100 г). При этом различия между образцами одного вида по перечисленным показателям могут быть не такими значительными, как у образцов разных видов: например, для линолевой кислоты разброс значений составлял от 113 до 182 мг/100 г. Наиболее существенные различия были найдены для пальмитиновой кислоты: минимальное значение 97 мг/100 г, а максимальное – 200 мг/100 г.

При анализе отдельных изученных показателей у образцов посевного овса установлено, что наибольшие значения по некоторым органическим кислотам имели пленчатые сорта Залп (Россия, Московская обл.) и Hurdal (Норвегия) и голозерные – Вятский (Россия, Кировская обл.), Gehl (Канада) и Numbat (Австралия). Повышенным содержанием отдельных жирных кислот обладали только голозерные сорта, а по отдельным аминокислотам выделялись пленчатые сорта Залп и Сапсан (Россия, Кировская обл.). Повышенным содержанием фитостеролов отличались пленчатые сорта Залп, Сапсан и Belinda (Швеция). Повышенными количествами большинства моно- и дисахаров отличался голозерный сорт Вятский.

Как и в случае с дикими видами овса, содержание сахарозы в исследованных зерновках в большинстве случаев в десятки раз превышает содержание фруктозы и глюкозы. Особо отметим голозерный сорт Gehl (Канада), у которого содержание моносахаров превышает содержание сахарозы в зерновке, и голозерный сорт Вятский с довольно низким содержанием сахарозы и высоким – моносахаров.

При рассмотрении суммарных значений содержания биохимических показателей зерновки посевного овса были установлены различия между пленчатыми и голозерными образцами (см. табл. 3). У пленчатого сорта Сапсан обнаружено повышенное содержание суммы органических кислот, у сорта Vogtus (Германия) – жирных кислот, у сорта Залп – многоатомных спиртов, у сортов Залп и Сапсан – фитостеролов, у сортов Залп и Hurdal –

Table 5. Total contents of biomolecules in grains of wild and common oat species differing in ploidy, mg/100 g)

Total content of	Diploids	Tetraploids	Hexaploids	Cultivated species
organic acids	117.56±0.06	121.92±0.06	101.35±0.05	49.90±0.02
fatty acids	755.30±0.08	787.30±0.08	950.77±0.10	494.00±0.10
amino acids	65.41±0.03	37.96±0.02	27.67±0.01	75.80±0.04
polyols	352.26±0.11	236.93±0.07	295.76±0.09	189.90±0.09
sterols	11.49±0.00	22.29±0.00	23.20±0.00	16.40±0.01
monosaccharides	1170.91±0.05	886.79±0.04	1058.88±0.04	901.50±0.09
disaccharides	3651.68±0.11	3894.83±0.12	1280.41±0.04	2361.40±0.09
sugars	4980.89±0.10	4781.62±0.10	2339.28±0.05	3262.90±0.09

дисахаров. У голозерных сортов Gehl и Numbat было повышенное содержание суммы органических кислот, у сортов Вятский и Numbat – жирных кислот, у сортов Вятский и Gehl – многоатомных спиртов и моносахаров, и у всех трех сортов наблюдалось повышенное содержание аминокислот.

При сравнении суммарных биохимических показателей образцов диких и культурных видов установлено, что образцы культурного вида имели повышенные суммарные показатели только по аминокислотам и сахарам. По остальным показателям образцы диких видов с разным уровнем пloidности характеризовались более высокими значениями основных групп соединений (табл. 5). Таким образом, можно заключить, что у культурных форм овса в ходе эволюции и селекционной проработки снизилось содержание многих важных групп соединений, что, очевидно, не связано напрямую с «генеральными направлениями» селекции, но может влиять на адаптивные свойства (см. примеры ослабления устойчивости селекционных форм к отдельным факторам среды). Исключение – содержание аминокислот, являющихся суммарной белковой частью зерновки, на повышение количества которой проводилась селекционная работа по посевному овсу.

Обсуждение

Сравнение метаболомных спектров диких и культурных форм (сортов) выявило следующие изменения в метаболомах при «окультуривании». Диапазон значений содержания яблочной кислоты у сортов сузился (11–43 мг/100 г) по сравнению с таковым у диких видов (7–80 мг/100 г). Аналогичная картина наблюдается и для молочной кислоты: ее содержание у сортов составляет 1,5–4,5 мг/100 г, у образцов диких видов – 1,18–10 мг/100 г. У изученных сортов резко возросло содержание в зерновках олеиновой кислоты – от 100 до 215 мг/100 г по сравнению с 2–24 мг/100 г у диких видов. Напомним, что олеиновая кислота – важный компонент здорового питания, легко усвояемая незаменимая жирная кислота. У сортов в два раза по сравнению с дикими видами снизилось содержание линолевой кислоты (до 150 мг/100 г), а содержание стеариновой кислоты «стабилизировалось» на уровне 7–13 мг/100 г (у образцов диких видов ее количество ме-

няется от 3 до 25 мг/100 г). Диапазон значений содержания сахарозы у диких видов (от 3 до 3000 мг/100 г) был больше по сравнению с сортами овса (от 800 до 2800 мг/100 г). Содержание моноацилглицерола (МАГ 16:0) у диких видов находилось в пределах 0,8–86 мг/100 г, а у сортов – только 6–20 мг/100 г. По содержанию МАГ-2 18:2 у образцов диких видов размах составляет 78–695 мг/100 г, у сортов овса эти значения намного меньше – 18–46 мг/100 г.

Согласно литературным данным (Смоликова и др., 2015), значимый вклад в сортовые различия рапса вносят яблочная кислота и линолевая, а также аминокислота – аланин. В нашем эксперименте содержание альфа-аланина также можно отнести к значимым показателям, т.е. к тем, по которым сравниваемые выборки сортов и видов различаются: у диких видов этот показатель равен 1–2,8 мг/100 г, а у сортов изменяется от 1,5 до 10 мг/100 г. Отмеченное совпадение с рапсом, надо полагать, не случайное. Очевидно, три упомянутых соединения вовлечены в процесс дифференциации форм растений на разных видовых уровнях у филогенетически удаленных видов растений (отличия между сортами и между видами, т.е. в процессе окультуривания). В нашей работе – это овес, а в цитируемой работе – крестоцветные (Смоликова и др., 2015).

В случаях с МАГ 16:0 и МАГ-2 18:2 речь может идти о каком-то биохимическом факторе (возможно, косвенном), связанном с процессом адаптации. Выше мы говорили о потере растениями ряда адаптационных свойств в процессе селекции (при окультуривании и особенно в процессе создания современных высокоспециализированных и интенсивных сортов, сопровождающемся снижением генетического полиморфизма сортовой популяции, характерного для стародавних сортов народной селекции). Невольно напрашивается аналогия с данными по анализу полиморфизма спектров запасных белков, степень которого у современных высокоспециализированных сортов закономерно снижается одновременно с утратой адаптивных свойств (устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды) (Пенева и др., 1998; Алпатьева, Губарева, 2002; Зеленская и др., 2004; Лоскутов и др., 2005; Конарев, 2006).

Сравнение метаболомных спектров диких видов и сортов позволило сделать следующие основные выводы. Выявлен ряд метаболитов, содержание которых меняется в процессе окультуривания или по которым дикие виды овса отличаются от сортов этой культуры. Среди этих соединений наряду с такими широко известными составляющими здорового питания, как олеиновая кислота, глюкоза, фруктоза и др., выявлены соединения (МАГ 16:0, МАГ-2 18:2 и др.), которые предположительно могут быть связаны с адаптивностью, в частности с устойчивостью к болезням и вредителям и абиотическим факторам среды.

По результатам изучения некоторые виды могут быть рекомендованы в качестве потенциального источника качественных биохимических признаков для межвидовой гибридизации овса. Это диплоидные виды *A. clauda* с повышенным содержанием в зерновке отдельных жирных кислот и *A. wiestii* с повышенным содержанием аминокислот, тетраплоидный *A. agadiriana* с повышенным содержанием отдельных жирных кислот и ситостерола, гексаплоидные виды *A. occidentalis* с уникальным составом жирных кислот в масле, МАГ и ситостерола, *A. sterilis* с повышенным содержанием ситостерола в масле, *A. fatua* и *A. ludoviciana* с низким содержанием сахарозы и высоким содержанием моносахаров в зерновке (см. табл. 4).

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 14-16-00072.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alpat'eva N.V., Gavriluk I.P., Leont'eva N.A., Oreshko L.S., Krasil'nikov V.N., Barsukova N.A., Loskutov I.G. Prolamins and celiac disease. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2004;6:41-49. (in Russian)
- Alpat'eva N.V., Gubareva N.K. Analysis of biotype composition in soft wheat landraces from the VIR collection in the course of storage and reproduction. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2002;3: 28-31. (in Russian)
- Ermakov A.I. (Ed.) *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy. [Methods of biochemical evaluation of plants]*. Leningrad, Agropromizdat Publ., 1987. (in Russian)
- Ermakov A.I., Ikonnikova M.I., Lukovnikova G.I., Yarosh N.P. The results and prospects of biochemical research of cultivated plants. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1969;41:326-364. (in Russian)
- Gu J., Jing L., Ma X., Zhang Z., Guo Q., Li Y. GC-TOF-MS-based serum metabolomic investigations of naked oat bran supplementation in high-fat-diet-induced dyslipidemic rats. *J. Nutritional Biochemistry*. 2015;26:1509-1519.
- Konarev A.V. Use of molecular markers in solving problems of genetic resources and breeding. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2006;6:4-23. (in Russian)
- Konarev A.V., Khoreva V.I. *Biokhimicheskie issledovaniya geneticheskikh resursov rasteniy v VIR [Biochemical research of plant genetic resources in VIR]*. Saint-Petersburg, VIR Publ., 2000. (in Russian)
- Konarev A.V., Shelenga T.V., Perchuk I.N., Blinova E.V., Loskutov I.G. Characterization of diversity among oat (genus *Avena L.*) accessions from the VIR collection, an initial material for breeding *Fusarium*-resistant oat varieties. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2015;5:2-10. (in Russian)
- Konarev A.V., Yarosh N.P. Nikolai Nikolaevich Ivanov, the founder of the Russian biochemistry of cultivated plants (120th birthday anniversary). *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2005;2:3-4. (in Russian)
- Krasil'nikov V.N. Current directions of using plant genetic resources in technology for functional and special foods. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2015;11:36-42. (in Russian)
- Leonova S., Shelenga T., Hamberg M., Konarev A., Loskutov I., Carlsson A. Analysis of oil composition in cultivars and wild species of Oat (*Avena sp.*). *J. Agric. Food Chemistry*. 2008;56:7983-7991.
- Lokhov P.G., Archakov A.I. Mass-spectrometry methods in metabolomics. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2008;54: 497-511. (in Russian)
- Loskutov I.G. Oves (*Avena L.*). *Rasprostraneniye, sistematika, evolyutsiya i selektsionnaya tsennost' [Oat (Avena L.): Distribution, taxonomy, evolution and breeding value]*. Saint-Petersburg, VIR Publ., 2007. (in Russian)
- Loskutov I.G., Gubareva N.K., Alpat'eva N.V. Polymorphism of avenin in the evaluation of wild oat species. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2005;2:43-48. (in Russian)
- Loskutov I.G., Rines H.W. *Avena L.* (Ed. C. Kole). *Wild Crop Relatives: Genomic & Breeding Resources*. Vol. 1. Cereals. Springer, Heidelberg, Berlin, New York, 2011;109-184.
- Peneva T.I., Konarev V.G., Kobylansky V.D., Lapikov N.S. Analysis of polymorphism for secalin spectrum in the development of winter rye cultivar Ilmen. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1998;1:55-62. (in Russian)
- Perkowski J., Stuper K., Buško M., Góral T., Kaczmarek A., Jeleń H. Differences in metabolomic profiles of the naturally contaminated grain of barley, oats and rye. *J. Cereal Sci.* 2012;56:544-551.
- Sánchez-Martín J., Heald J., Kingston-Smith A., Winters A., Rubiales D., Sanz M., Mur L. A. J., Prats E. A metabolomic study in oats (*Avena sativa*) highlights a drought tolerance mechanism based upon salicylate signalling pathways and the modulation of carbon, antioxidant and photo-oxidative metabolism. *Plant, Cell & Environment*. 2015;38:1434-1452.
- Shelenga T.V., Konarev A.V., Dzubenko N.I., Malyshev L.L., Takai T. Evaluation of accessions of meadow fescue from the Vavilov Institute of Plant Industry containing symbiotic endophytic fungus of genus *Neotyphodium*. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2006;1:20-22. (in Russian)
- Shelenga T.V., Solov'eva A.E., Shavarda A.L., Konarev A.V. Research of the metabolomes of crops of the VIR collection. *Tezisy dokladov mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 120-letiyu VIR [Abstracts of Intern. sci. conference dedicated to the 120th anniversary of VIR, October 6-8, 2014]*. Saint-Petersburg, 2014:98. (in Russian)
- Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*. 2008;132:199-208.
- Sitkin S.I., Tkachenko E.I., Vakhitov T.Ya., Oreshko L.S., Zhigalova T.N. Metabolome of blood serum as analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in patients with ulcerative colitis and celiac disease. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2013; 12:44-57. (in Russian)
- Smolikova G.N., Shavarda A.L., Alekseychuk I.V., Chantseva V.V., Medvedev S.S. The metabolomic approach to the assessment of cultivar specificity of *Brassica napus L.* seeds. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016;1:78-83.
- Zelenskaya E.G., Konarev A.V., Loskutov I.G., Gubareva N.K., Strel'chenko P.P. Characterization of avenin polymorphism in oat (*Avena sativa L.*) landraces from the VIR collection. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2004;6:50-58. (in Russian)



Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров

М.Ф. Санамьян¹✉, Ш.У. Бобохужаев¹, А.Х. Макамов², С.Г. Ачилов², И.Ю. Абдурахмонов²

¹ Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан

² Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

Использование моносомных линий значительно увеличивает эффективность молекулярно-генетического анализа и получения высококачественных селекционных линий с замещением определенных хромосом. В связи с этим было важно создать полный набор анеуплоидных линий для каждой хромосомы хлопчатника. Достижению этой цели способствовало получение новых моносомных линий хлопчатника узбекской коллекции с использованием хромосом-специфичных маркеров (SSR) и транслокационных линий для идентификации хромосом. В статье обобщены данные многолетних исследований, посвященных созданию моносомных линий, включая происхождение 95 первичных моносомиков хлопчатника, их цитогенетические и морфологические особенности, а также идентификацию унисвалентных хромосом с помощью транслокационного теста и SSR-маркеров. Линии идентифицированы по хромосомам 2, 4, 6 A_t-субгенома и хромосомам 18, 22 D_t-субгенома, а также выявлен телоцентризм для 11 хромосомы A_t-субгенома хлопчатника. Остальные 22 моносомные линии были идентифицированы как дубликаты трех хромосом (2, 4, 6). Созданный материал будет полезен для молекулярно-генетического картирования, создания линий с замещением хромосом и для селекции хлопчатника.

Ключевые слова: хлопчатник (*Gossypium hirsutum* L.); моносомные линии, микроспорогенез; SSR-маркеры.

The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR-markers

M.F. Sanamyan¹✉, Sh.U. Bobokhujaev¹, A.X. Makamov², S.G. Achilov², I.Y. Abdurakhmonov²

¹ National University of Uzbekistan named M. Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan

² Center of Genomics and Bioinformatics UAS, Tashkent, Uzbekistan

The use of monosomic lines significantly increases the effectiveness of molecular-genetic analysis and the development of superior quality breeding lines via substitutions by alien chromosomes. A complete set of aneuploid series for each cotton chromosome was required. Simple sequence repeats (SSR) have been applied as useful markers for understanding cotton genetics. Several DNA markers have already been assigned to the individual chromosomes of *Gossypium hirsutum*. The primary objective of this paper is to report the creation of new monosomic lines and the use of chromosome specific simple sequence repeat (SSR) markers and translocation lines for chromosome identification to confirm chromosome specificity of monosomic lines in the Uzbek collection. Here, we summarize data on the development of a monosomic stock collection of cotton (*G. hirsutum* L.) from Uzbekistan, including the origin of 95 primary monosomics, their cytogenetic characteristics, morphological features and their identification by translocation tests and chromosome SSR-markers. Our results indicated several different monosomic lines identified by chromosomes 2, 4, 6 and telosome 11 of the A_t subgenome and chromosomes 18 and 22 of the D_t subgenome, 22 monosomes were identified as duplicates of three monosomes (chromosomes 2, 4 and 6). Chromosome 4 of the A_t subgenome was recovered more frequently (18 times) than chromosome 2 of the A_t subgenome (4 times) and chromosome 6 of the A_t subgenome (3 times) during pollen irradiation at different doses and in the progeny of the desynaptic plants. These lines will be useful for molecular mapping and enhancement of Upland cotton.

Key words: cotton (*Gossypium hirsutum* L.); monosomic lines; microsporogenesis; SSR-markers; identification of chromosomes.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахмонов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):643-652. DOI 10.18699/VJ16.186

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sanamyan M.F., Bobokhujaev Sh.U., Makamov A.X., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Y. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR-markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):643-652. DOI 10.18699/VJ16.186

REVIEW

Received 05.07.2016

Accepted for publication 29.09.2016

© AUTHORS, 2016

Культивируемый хлопчатник *Gossypium hirsutum* L. ($2n = 52$) является аллотетраплоидом и включает два субгенома (A_1 и D_1), поэтому он толерантен к потере отдельных хромосом или их плечей. На протяжении длительного времени в США проводились исследования по выявлению моносомиков хлопчатника среди сортовых, гибридных и облученных популяций, а также среди цитогенетических линий (Brown, Endrizzi, 1964; Endrizzi, Brown, 1964; Galen, Endrizzi, 1968; Endrizzi, Ramsay, 1979). До 1985 г. были выделены и идентифицированы моносомы по 15 из 26 негомологичных хромосом *G. hirsutum*.

Процесс создания моносомных линий растянулся на долгие годы из-за невозможности использовать гаплоиды в качестве источников новых моносомиков, как это сделано у пшеницы (Sears, 1954), и вследствие высокой стерильности гаплоидов (Endrizzi, 1966), а также появления в потомстве гаплоидов нормальных дисомных растений (Санамьян, 2010). Поэтому созданная в США цитогенетическая коллекция хлопчатника характеризуется моносомией не по всем хромосомам генома *G. hirsutum* – отсутствуют моносомы и телоцентрики по пяти негомологичным хромосомам (хромосома 13 A_1 -субгенома и хромосомы 20, 21, 23 и 24 D_1 -субгенома) (Saha et al., 2015). Тем не менее существующие анеуплоидные линии хлопчатника широко использовались для хромосомной локализации маркерных генов (White, Endrizzi, 1965; Stelly, 1990; Endrizzi, Ray, 1991, 1992; Samora et al., 1994; Kakani et al., 1999; Kohel et al., 2002) и биохимических локусов (Saha, Stelly, 1994). В последнее время в США проводятся исследования по созданию серии замещенных линий хлопчатника с целью переноса генетического материала от других тетраплоидных видов в геном *G. hirsutum* посредством контролируемой межвидовой интрогрессии (Saha et al., 2004, 2006, 2013). Кроме того, использование гипоанеуплоидных гибридов F_1 , полученных от скрещивания анеуплоидов вида *G. hirsutum* с линией Pima 3-79 вида *G. barbadense* L. в молекулярно-генетических анализах, позволило начать хромосомную локализацию молекулярных микросателлитных маркеров (Liu et al., 2000).

Как известно, в Национальном университете Узбекистана (НУУз) в течение многих лет под руководством академика Д.А. Мусаева (1979) проводились исследования по созданию генетической коллекции хлопчатника *G. hirsutum*. Необходимость использования цитогенетически маркированных линий хлопчатника в генетическом анализе и недоступность на то время линий американской цитогенетической коллекции способствовали началу работ по получению растений хлопчатника с различными хромосомными абберациями в результате воздействия нескольких типов облучения (Санамьян, Мусаев, 1990). В итоге была создана уникальная цитогенетическая коллекция, которая по числу линий занимает второе место в мире после аналогичной американской коллекции (Sanamyan et al., 2014).

В статье представлены данные о создании моносомных линий цитогенетической коллекции хлопчатника НУУз с унифицированной идентификацией унивалентов с помощью транслокационного теста и молекулярных маркеров.

Происхождение первичных моносомиков хлопчатника *G. hirsutum*

Вся коллекция первичных моносомиков хлопчатника НУУз создавалась в единой генотипической среде на основе высокоинбредной линии Л-458 сорта 108-Ф, полученной М.Ф. Абзаловым и Г.А. Фатхуллаевой. При этом использовались разные методы облучения семян и пыльцы, а также изучалось потомство растений с транслокациями и десинапсисом.

Большая часть коллекции моносомиков была получена в результате воздействия двух видов радиации: облучение семян тепловыми нейтронами и облучение пыльцы гамма-лучами, причем между ними наблюдались значительные различия по числу растений с отсутствием отдельных хромосом (табл. 1). Так, в результате облучения семян тепловыми нейтронами в дозах 15, 25, 27 и 35 Гр было получено 11 первичных моносомиков из 335 растений непосредственно в M_1 , M_2 и M_3 поколениях, причем четыре моносомы являлись одновременно гетерозиготами по транслокациям (Санамьян, 2003а; Рахматуллина, Санамьян, 2007а, б).

Большинство первичных моносомиков хлопчатника (34) было получено в M_1 поколении в результате опыления пыльцой, облученной гамма-лучами в дозах 10, 15, 20 и 25 Гр, из которых 7 моносомиков характеризовались одновременным присутствием транслокаций (Санамьян, 2003б). В последующих поколениях происходило снижение числа моносомиков (24 и 9 соответственно), так же как и моносомиков с транслокациями (1) (Санамьян, 2003в). В целом в результате использования двух видов радиации, а также анализа трех поколений после облучения было получено 78 первичных моносомиков, из которых 12 имели одновременно транслокации, вовлекшие негомологичные хромосомы (Sanamyan et al., 2000, 2011).

Кроме того, для получения анеуплоидов мы использовали десинаптические формы, являющиеся ценным источником моносомии у других видов растений. Так, шесть исходных растений с десинаптическим эффектом были получены в результате опыления облученной пыльцой, а одно (356/8) – в результате облучения семян тепловыми нейтронами (Sanamyan et al., 2011). Все десинаптики различались между собой по числу неспаренных хромосом (от 2 до 28 унивалентов). Нарушения в расхождении хромосом приводили к случайному распределению унивалентов между полюсами и формированию значительного числа тетрад с микроядрами (до $13,42 \pm 0,87\%$), а также к снижению мейотического индекса (до $75,07 \pm 1,11$). Фертильность пыльцы у десинаптиков различалась существенно, вплоть до полустерильности ($61,35 \pm 2,43\%$). В целом в потомстве шести десинаптических генотипов и одного растения с неустановленным кариотипом, ранее обнаруженного в потомстве десинаптика, было выделено 16 первичных моносомиков (Sanamyan et al., 2011).

В потомствах двух растений M_2 , гетерозиготных по транслокациям, были выделены два первичных моносомы (Мо30 и Мо67). Поскольку исходные растения M_1 характеризовались небольшим десинапсисом и высокой частотой формирования квадριвалентов, точное определение идентичности унивалента и хромосом, вовлеченных в транслокацию, станет возможным лишь после

Table 1. The origin of cotton (*G. hirsutum* L.) primary monosomics

Treatment	Irradiation dose, Gy	Number of primary monosomics			Monosomic lines
		M ₁	M ₂	M ₃	
Irradiation of seeds with thermal neutrons	15	3	1	0	Mo58, Mo59, Mo60, Mo74
	25	0	1	0	
	27	0	1	2	Mo1
	35	1	2	0	Mo56, Mo62
Total		4	5	2	7
Irradiation of pollen with gamma rays	10	5	4	3	Mo10, Mo39, Mo40, Mo41, Mo50, Mo81, Mo82
	15	4	9	1	Mo3, Mo21, Mo31, Mo53, Mo78
	20	11	8	5	Mo4, Mo7, Mo11, Mo22, Mo27, Mo28, Mo34, Mo35, Mo36, Mo66, Mo75, Mo90, Mo94
	25	14	3	0	Mo9, Mo13, Mo15, Mo16, Mo17, Mo19, Mo38, Mo46, Mo48, Mo76, Mo77
Total		34	24	9	36

их идентификации. У мягкой пшеницы в потомстве растения с транслокацией также был получен моносомик, но унивалент и транслоцированная хромосома были негомолгичными хромосомами генома (Sears, 1954).

Цитогенетические особенности растений хлопчатника с отсутствием отдельных хромосом

Как известно, культивируемый аллотетраплоидный хлопчатник *G. hirsutum* ($2n = 52$) толерантен к потере отдельных хромосом. Модальной конъюгацией первичных моносомиков тетраплоидного хлопчатника в метафазе I мейоза являются 25 бивалентов и один унивалент. Анализ метафазы I 95 первичных моносомиков нашей цитогенетической коллекции обнаружил модальную конъюгацию только у 40 первичных моносомиков, тогда как у 32 наблюдалось формирование дополнительных унивалентов. Однако присутствие унивалентов и нарушения в их расхождении привели к небольшому снижению мейотического индекса (до $89,00 \pm 0,86$) лишь у одного моносомика, хотя по наличию микроядер в тетрадах некоторые из них сильно отличались от растений контроля.

У семи моносомиков (Mo6, Mo7, Mo19, Mo30, Mo56, Mo61, Mo62) помимо унивалентов и бивалентов формировались редкие триваленты, которые свидетельствовали о конъюгации унивалента с двумя гомеологами. Другие 12 моносомиков характеризовались присутствием квад-ривалентов в материнских клетках пыльцы (МКП), что указывало на их гетерозиготность по межхромосомным обменам.

При анализе унивалентных хромосом у 44 моносомиков коллекции обнаружены средние по величине униваленты, тогда как 23 моносомика имели крупные униваленты. Число моносомиков с мелкими унивалентами было немногим больше (27), причем среди них выделено шесть моносомиков с очень мелкими унивалентами.

Исследования по субгеномной приписке моносом в США установили A_h -субгеномную принадлежность унивалентов, ранее классифицированных как хромосомы

среднего размера, а также выявили значительное отклонение от отношения 1 : 1, ожидаемого на случайной основе, числа унивалентов субгенома A_h к числу унивалентов субгенома D_h (5 : 1) (Edwards et al., 1980a). Дополнительные исследования внесли уточнения в это соотношение, где из 95 идентифицированных унивалентных хромосом 79 имели A_h -субгеномную и только 16 – D_h -субгеномную принадлежность (4 : 1) (Edwards et al., 1980b). Это позволило считать, что преимущественная потеря хромосом, принадлежащих к A_h -субгеному, обусловлена существованием генетической системы регуляции расхождения хромосом, а не их размером (Myles, Endrizzi, 1989).

Анализ микроспор выявил высокий мейотический индекс у большинства моносомиков хлопчатника, что говорит о регулярном расхождении унивалентов. Небольшое снижение мейотического индекса наблюдалось лишь у 12 моносомиков нашей коллекции. Два моносомика (Mo4 и Mo74) характеризовались большим снижением мейотического индекса (до $68,32 \pm 1,10$ и $76,07 \pm 0,93$ % соответственно) и увеличением доли тетрад с микроядрами (до $6,87 \pm 0,60$ и $21,56 \pm 0,89$ % соответственно).

При изучении фертильности пыльцы после окраски ацетокармином обнаружена высокая фертильность только у 30 первичных моносомиков хлопчатника, тогда как у остальных этот показатель был снижен (до 5 %). У восьми моносомиков (Mo5, Mo7, Mo10, Mo44, Mo45, Mo47, Mo57, Mo74) пыльца отличалась стерильностью, в том числе у двух из них (Mo5 и Mo44) семян вообще не завязалось, что свидетельствует о их полной стерильности.

Воспроизводство моносомного состояния у растений хлопчатника с отсутствием отдельных хромосом

Воспроизводство моносомного состояния изучалось в само- и перекрестноопыленных потомствах в условиях поля и теплицы. В условиях поля короткий летний период не позволил изучить большую часть растений и установить точную частоту воспроизводства, хотя моносомики и были воспроизведены в 18 семьях исходных

первичных моносомиков. Воспроизводство моносомного состояния в условиях теплицы выявило большие различия по этому признаку между разными моносомиками – от высокой частоты (44,44 % у Мо16 и Мо84) до очень низкой (1,79 % у Мо34). Самые высокие частоты воспроизводства наблюдались у 12 моносомиков (Мо16, Мо31, Мо58, Мо59, Мо62, Мо66, Мо71, Мо72, Мо77, Мо82, Мо84, Мо90), что указывало на высокую частоту передачи гамет с отсутствием хромосомы. Другие 12 моносомиков (Мо3, Мо4, Мо9, Мо15, Мо34, Мо35, Мо40, Мо41, Мо56, Мо61, Мо67, Мо85) имели наименьшую частоту воспроизводства (от 1,79 % у Мо34 до 9,38 % у Мо67) вследствие редкой передачи $n-1$ гамет и требовали больших популяций для их обнаружения. У 29 первичных моносомиков частота воспроизведения была средней (от 14,29 % у Мо10 и Мо74 до 29,41 % у Мо11). Значительные различия в частоте передачи моносомного состояния в потомстве объяснялись разной жизнеспособностью гамет с отсутствием хромосомы, вовлекших специфические хромосомы. Помимо моносомиков, в потомствах девяти моносомных растений (Мо2, Мо6, Мо19, Мо21, Мо22, Мо34, Мо49, Мо61, Мо68) регистрировались растения с телоцентриками и с изохромосомой, что свидетельствует о нестабильности унивалента у исходных моносомиков. Известно, что унивалентные хромосомы у трех моносомиков хлопчатника (Мо12, Мо22 и Мо25) американской коллекции значительно чаще остальных хромосом претерпевали *misdivision* (неправильные поперечные деления унивалентов в районе центромеры), что указывало на их нестабильность (Endrizzi, Ramsay, 1980; Endrizzi et al., 1985). Показано также, что хромосома 5А чаще претерпевала поперечное деление в генотипической среде сорта Чайниз Спринг (39,7 %), поскольку генотип Чайниз Спринг был наиболее благоприятен для высокой степени *misdivision*, причем свыше половины их приводило к образованию изохромосом (Sears, 1952).

Некоторые особенности моносомных линий хлопчатника

Цитогенетический анализ мейоза у моносомных линий, полученных в потомстве исходных моносомиков, обнаружил модальную конъюгацию хромосом у 30 моносомных линий, тогда как остальные 20 линий характеризовались присутствием в МКП дополнительных унивалентов. Кроме того, линия Мо4 отличалась присутствием редких тривалентов ($0,12 \pm 0,06$ в среднем на клетку), что было следствием конъюгации унивалентной хромосомы с гомеологичными хромосомами. При изучении моносомных линий на стадии тетрад выявлен высокий мейотический индекс у большинства из них, за исключением линии Мо19, характеризующейся небольшим снижением мейотического индекса и увеличением числа тетрад с микроядрами (до $3,00 \pm 0,20$ %), а также линии Мо84 с варьированием как мейотического индекса в различных бутонах (от $49,90 \pm 1,12$ до $95,48 \pm 0,27$ %), так и тетрад с микроядрами (от $12,44 \pm 0,74$ до $0,53 \pm 0,10$ %). Анализ фертильности пыльцы у моносомных линий показал высокую фертильность у большинства из них, за исключением четырех линий (Мо27, Мо53, Мо56, Мо67) с небольшим снижением фертильности (до $87,71 \pm 0,99$ %) и линии

Мо10 со значительным снижением фертильности пыльцы (до $19,35 \pm 2,37$ %), что говорит о частичной стерильности пыльцы с анеуплоидией.

Моносомия оказала специфическое действие на морфологические признаки: большинство моносомных линий характеризовалось тонкостью стебля, слабой облиственностью, мелким размером листьев и цветков, укороченностью междоузлий, деформированностью и небольшим размером коробочек (рис. 1). Вместе с тем четыре моносомные линии (Мо35, Мо36, Мо40, Мо50) практически не отличались от дисомных сибсов. Кроме того, у двух линий (Мо7 и Мо56) отмечалось искривление плодовых ветвей, а у трех (Мо75, Мо76 и Мо82) – удлинение междоузлий. Четыре моносомные линии (Мо4, Мо10, Мо46, Мо67) характеризовались слабой бутонизацией и цветением, тогда как три линии (Мо22, Мо39, Мо56) выделялись обильной бутонизацией и цветением, но низкой завязываемостью семян и коробочек. Многие моносомные линии имели мелкие размеры цветков и прицветников, однако шесть линий (Мо4, Мо10, Мо16, Мо34, Мо46, Мо48) выделялись значительной редукцией размеров цветка, а четыре линии (Мо17, Мо19, Мо28, Мо62) – укороченностью рыльца. Самые заметные изменения произошли с размером и формой коробочек, которые изначально имели более мелкие размеры и преимущественно шаровидную или удлиненную форму. Многие коробочки моносомиков характеризовались ребристостью или деформированностью за счет присутствия в большом количестве абортивных яйцеклеток в виде улюков и невызревших семян (рис. 2).

Использование моносомных межвидовых гибридов и SSR-маркеров для идентификации унивалентных хромосом

В последние годы получили развитие работы по идентификации хромосом с помощью молекулярных микросателлитных локусов (SSR-маркеров), которые ранее были картированы на хромосомах генома хлопчатника при помощи гипоанеуплоидных замещенных гибридов. Подобные молекулярно-генетические исследования проводятся и в Узбекистане. Они позволяют охарактеризовать специфические последовательности ДНК, ассоциированные с важнейшими хозяйственно ценными признаками хлопчатника (Abdurakhmonov et al., 2007). Современная коллекция SSR-маркеров, используемая для изучения генома хлопчатника, включает около 500 BNL SSR-маркеров (Национальная Брукхейвенская лаборатория, USA (Blenda et al., 2012)), 309 JESPR SSR-маркеров (Reddy et al., 1998), а также 418 CIR SSR-маркеров (Nguyen et al., 2004; Lacape et al., 2009). При этом в последнее время стали использоваться EST специфичные микросателлитные маркеры (Blenda et al., 2012), а также SSR-маркеры на основе бактериальных искусственных хромосом (BACs) (Yu et al., 2012).

С целью создания хромосом-замещенных линий хлопчатника были проведены скрещивания моносомных линий цитогенетической коллекции с линией Pima 3-79 (USA) вида *G. barbadense*, полученной в результате спонтанного удвоения хромосом у гаплоидного растения. Среди гибридной популяции F_1 при помощи цитогенетического анализа выделяли моносомные межвидовые гибридные



Fig. 1. Cotton monosomic lines.



Fig. 2. Bolls of cotton monosomic lines.

Table 2. Microsatellite marker loci used in the analysis of monosomic hybrids between cotton species

Chromosome	SSR marker	Collection	Amplicon size of the SSR marker		References
			<i>G. hirsutum</i> (L-458)	<i>G. barbadense</i> (Pima 3-79)	
2	BNL3590	BNL	173, 181	175, 179	Reddy et al., 1998
	GH-198	Gh	190	180	Hoffman et al., 2007
	BNL3971	BNL	144	119	Reddy et al., 1998
	BNL1897	BNL	145	136	»
	BNL1434	BNL	245	262	»
4	BNL2572	BNL	250	236	»
	CIR122	CIR	142	146	Nguyen et al., 2004
	CIR048	CIR	125, 134	132, 143	»
	CIR249	CIR	186	194	»
	GH-107	Gh	380	280	Hoffman et al., 2007
	Gh117	Gh	260	240	»
	BNL4047	BNL	157	163	Reddy et al., 1998
6	BNL2884	BNL	164	172	»
	BNL1064	BNL	141	152	»
	Gh032	Gh	90	80	Hoffman et al., 2007
	CIR203	CIR	164	172	Nguyen et al., 2004
	Gh082	Gh	90	80	Hoffman et al., 2007
	TMB0853	TMB	250	240	Yu et al., 2012
	TMB1277	TMB	245	255	»
11	BNL3442	BNL	115, 130	115, 145	Reddy et al., 1998
	Gh246	Gh	121	140, 145	Hoffman et al., 2007
18	BNL3280	BNL	230	210, 255, 265	Reddy et al., 1998
22	JESPR235	JESPR	142	112	Yu et al., 2012

растения. Для хромосом-специфичной характеристики использовали микросателлитные маркеры хлопчатника, полученные из международной коллекции. Микросателлитные маркеры являлись специфичными к 26 негомолотичным хромосомам *G. hirsutum*, по четыре полиморфных маркера на каждую хромосому. Для молекулярного анализа моносомных гибридных растений F_1 использовались принципы молекулярного делеционного анализа (Liu et al., 2000). Поскольку ряд ДНК-маркеров ранее уже был картирован на соответствующих хромосомах хлопчатника вида *G. hirsutum*, мы использовали хромосом-специфичные SSR-маркеры для идентификации моносомных линий нашей коллекции. Выявление и генотипирование аллелей SSR-маркеров выполнялось способом, описанным ранее, где микросателлитные локусы амплифицировали стандартным ПЦР-методом. Для локализации SSR-локусов на хромосомах скринировались моносомные гибридные растения F_1 по аллели линии Л-458 с использованием полиморфных и/или неполоморфных пар праймеров. При локализации SSR-локусов в местах, отличных от сегмента с отсутствием хромосом, наблюдалось присутствие маркера линии Л-458 и гетерозиготный фенотип у гибридов. Если же SSR-локус находился в сегменте с отсутствием хромосомы у гибридных анеуплоидных

растений, то на электрофореграмме отсутствовала аллель линии Л-458, но наблюдалась донорская аллель от линии 3-79 вида *G. barbadense* вследствие гемизиготности.

В результате молекулярно-генетического анализа у четырех моносомных межвидовых гибридов F_1 (Mo11 × Pima 3-79, Mo16 × Pima 3-79, Mo19 × Pima 3-79, Mo93 × Pima 3-79) было обнаружено присутствие полиморфных аллелей только от вида *G. barbadense*, тогда как аллели линии Л-458 вида *G. hirsutum* отсутствовали, что указывало на локализацию хромосом-специфичных SSR-маркеров BNL3590 и GH-198 у гибрида F_1 Mo11 × Pima 3-79, маркеров BNL3590, BNL3971, GH-198 – у гибридов F_1 Mo16 × Pima 3-79 и Mo19 × Pima 3-79, а маркеров BNL1434, BNL1897 и BNL3971 – у гибрида F_1 Mo93 × Pima 3-79. Поскольку ранее перечисленные маркеры были локализованы на хромосоме 2 A_4 -субгенома хлопчатника, можно заключить, что четыре моносомные линии коллекции НУУз – Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93 – являются дубликатами и имеют моносомию по хромосоме 2 A_4 -субгенома (табл. 2).

Анализ шести моносомных межвидовых гибридов F_1 (Mo70 × Pima 3-79, Mo71 × Pima 3-79, Mo76 × Pima 3-79, Mo81 × Pima 3-79, Mo89 × Pima 3-79, Mo90 × Pima 3-79) также выявил наличие только полиморфных аллелей

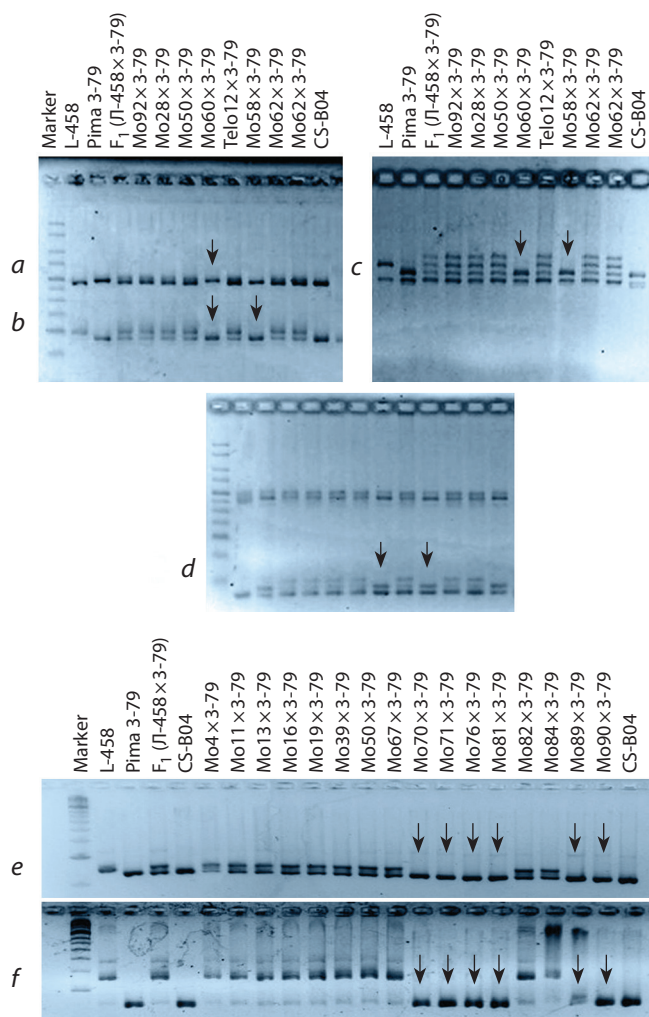


Fig. 3. Electrophoretic image of SSR markers specific to chromosome 4 of the A_1 subgenome in the cotton monosomic interspecies hybrids F_1 : a – CIR249; b – BNL2572; c – Gh117; d – BNL4047; e – BNL2572; f – Gh107. Arrows indicate missing loci.

G. barbadense, тогда как аллели линии Π -458 не регистрировались, что свидетельствовало о локализации трех хромосом специфичных маркеров BNL2572, CIR122 и GH-107 в геноме вышеперечисленных моносомных межвидовых гибридов F_1 . Исследование еще 12 моносомных межвидовых гибридов F_1 (Mo7 $\times$ Pima 3-79, Mo31 $\times$ Pima 3-79, Mo38 $\times$ Pima 3-79, Mo58 $\times$ Pima 3-79, Mo59 $\times$ Pima 3-79, Mo60 $\times$ Pima 3-79, Mo66 $\times$ Pima 3-79, Mo69 $\times$ Pima 3-79, Mo72 $\times$ Pima 3-79, Mo73 $\times$ Pima 3-79, Mo75 $\times$ Pima 3-79, Mo79 $\times$ Pima 3-79) также выявило присутствие только полиморфных аллелей линии 3-79, тогда как аллели линии Π -458 отсутствовали, что указывает на локализацию хромосом-специфичных маркеров BNL2572, CIR122 и CIR048 на вышеперечисленных 12 гибридах F_1 . Поскольку ранее данные маркеры уже были картированы на хромосоме 4 хлопчатника, можно считать, что 18 моносомных линий – Mo7, Mo31, Mo38, Mo58, Mo59, Mo60, Mo66, Mo69, Mo70, Mo71, Mo72, Mo73, Mo75, Mo76, Mo79, Mo81, Mo89 и Mo90 нашей цитогенетической коллекции являются дубликатами и ха-

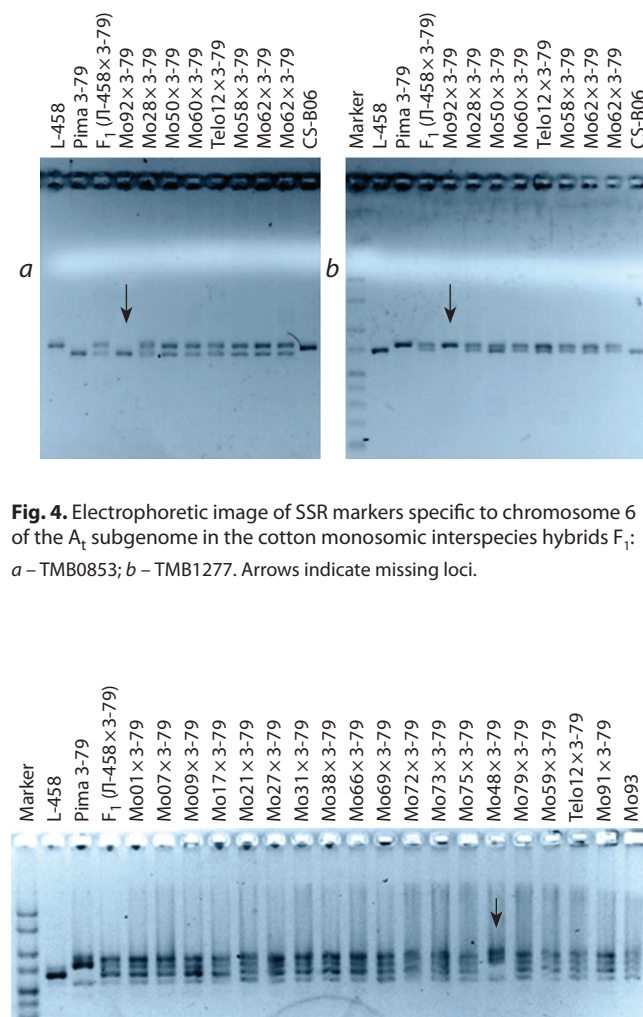


Fig. 4. Electrophoretic image of SSR markers specific to chromosome 6 of the A_1 subgenome in the cotton monosomic interspecies hybrids F_1 : a – TMB0853; b – TMB1277. Arrows indicate missing loci.

Fig. 5. Electrophoretic image of SSR markers specific to chromosome 18 of the D_1 subgenome in the cotton monosomic interspecies hybrids F_1 : BNL3280.

The arrow indicates missing loci.

актеризуются отсутствием хромосомы 4 A_1 -субгенома хлопчатника (рис. 3).

Анализ трех моносомных межвидовых гибридов F_1 (Mo13 $\times$ Pima 3-79, Mo67 $\times$ Pima 3-79, Mo92 $\times$ Pima 3-79) также выявил присутствие только полиморфных аллелей *G. barbadense*, тогда как аллели линии Π -458 отсутствовали, что продемонстрировало локализацию восьми хромосом-специфичных маркеров (BNL1064, BNL2884, BNL3650, CIR203, Gh032, Gh039, Gh082 и TMB1538) на изучаемых моносомных межвидовых гибридах F_1 . Ранее эти маркеры были картированы на хромосоме 6 A_1 -субгенома хлопчатника, поэтому можно считать, что три моносомные линии цитогенетической коллекции – Mo13, Mo67 и Mo92 – также являются дубликатами с отсутствием по хромосоме 6 A_1 -субгенома (рис. 4).

Моносомная линия Mo48 была идентифицирована с помощью маркера BNL3280. Поскольку ранее он был картирован на хромосоме 18 D_1 -субгенома хлопчатника, можно считать, что линия Mo48 цитогенетической коллекции является моносомной по хромосоме 18 D_1 -субгенома (рис. 5).

Моносомная линия Мо17 также была идентифицирована, поскольку с помощью молекулярного анализа один маркер – JESPR235 – был локализован на унивалентной хромосоме. Ранее он был картирован на хромосоме 22 D₁-субгенома хлопчатника, поэтому можно считать, что линия Мо17 цитогенетической коллекции является моносомной по хромосоме 22 D₁-субгенома.

Растение с телоцентрической хромосомой, выделенное в потомстве Мо21, тоже было изучено с помощью молекулярного анализа. Показано наличие трех маркеров – BNL3442, Gh246, CIR212, локализованных на телоцентрическом плече хромосомы. Поскольку ранее маркеры BNL3442, Gh246 и CIR212 были картированы на хромосоме 11 A₁-субгенома хлопчатника, можно считать, что телоцентрическая линия – тело 21 цитогенетической коллекции – характеризуется отсутствием плеча по хромосоме 11 A₁-субгенома.

Таким образом, использование SSR-маркеров позволило идентифицировать отсутствие отдельных хромосом и одного плеча хромосомы у 28 анеуплоидных линий хлопчатника, что значительно облегчило процесс идентификации хромосом.

Идентификация и нумерация унивалентных хромосом с помощью транслокационного теста

Отсутствие четких морфологических маркеров, а также большое число мелких хромосом в кариотипе хлопчатника *G. hirsutum* не позволяют идентифицировать хромосомы с помощью общепринятых методов кариологического анализа. Поэтому для идентификации отдельных хромосом у хлопчатника в США использовались специально созданные транслокационные линии с пронумерованными хромосомами. Для этого M.S. Brown с сотрудниками (Brown, 1965, 1978, 1980) на протяжении более 20 лет создавала 63 транслокационные линии у хлопчатника *G. hirsutum* с помощью X-, гамма-, Бикини-радиации и облучения быстрыми нейтронами семян или пыльцы различных сортов, а также нескольких линий. В 58 линий было вовлечено две негомологичные хромосомы, в три – три хромосомы и в одну – четыре. Для идентификации и нумерации хромосом проводились исследования по отнесению транслоцированных хромосом к субгеномам. В результате выяснилось, что хромосома 26 не была вовлечена ни в одну из транслокаций и определялась методом исключения.

Унифицированная идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника цитогенетической коллекции Узбекистана была начата путем скрещиваний с тестерной серией идентифицированных транслокаций с пронумерованными хромосомами, полученными от проф. Д. Стелли через ARS-USDA программу обмена и анализа конъюгации у гибридов. Выявление в МКП у гибридных моносомиков квадριвалента и унивалента указывало на негомологичность унивалентной хромосомы транслоцированной хромосоме. Если же в МКП у гибридных моносомиков обнаруживались триваленты, это указывало на гомологичность унивалента и одной из транслоцированных хромосом. В таком случае проводилось скрещивание этого моносомика с другими

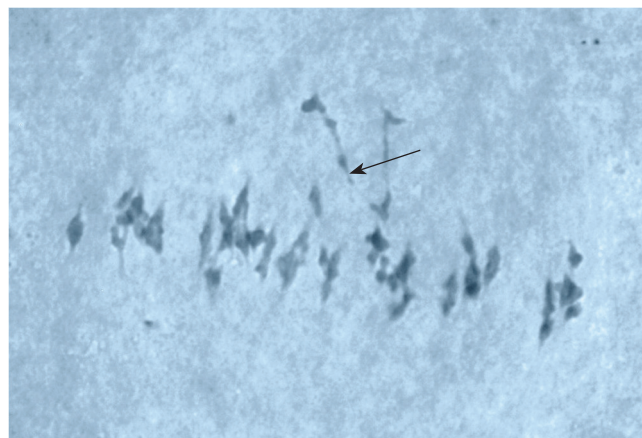


Fig. 6. "Critical chromosome configuration" in meiotic metaphase I cells with 24^{II} + 1^{III} in cotton monosomic translocation hybrid Mo19 × TT 2R-8Rb.

The arrow indicates the trivalent.

линиями, у которых одна из транслоцированных хромосом была такая же, как и у первой линии. Анализ ассоциаций хромосом у гибридов позволял идентифицировать унивалентную хромосому как специфическую хромосому набора (Endrizzi et al., 1985).

В результате проведенных скрещиваний была обнаружена негомологичность унивалентной хромосомы у Мо19 одной из транслоцированных хромосом в тестерных линиях **TT 6L-7L** и **TT 10R-11R**, поскольку у моносомных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 23 бивалента плюс один квадριвалент и один унивалент. В случае скрещиваний с линиями **TT 2R-8Rb** и **TT 2L-6R** установлена гомологичность унивалента у Мо19 и одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента плюс один тривалент. У тестерной линии **TT 2R-8Rb** в транслокацию вовлечены хромосомы 2 и 8, а у линии **TT 2L-6R** транслокация затронула хромосомы 2 и 6, следовательно, одна из этих хромосом гомологична унивалентной хромосоме у моносомной линии Мо19. Поскольку в обеих линиях участвует одна общая хромосома 2, то унивалентной хромосомой у моносомной линии Мо19 является хромосома 2 A₁-субгенома хлопчатника (рис. 6).

При анализе гибридов моносомной линии Мо75 с линиями **TT 4L-19R** и **TT 4R-15L** была установлена гомологичность унивалента линии Мо75 одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента плюс один тривалент. У транслокационной линии **TT 4L-19R** в транслокацию вовлечены хромосомы 4 и 19, а у линии **TT 4R-15L** в транслокации участвуют хромосомы 4 и 15, следовательно, одна из этих трех хромосом гомологична унивалентной хромосоме у моносомной линии Мо19. Так как в обе транслокационные линии – **TT 4L-19R** и **TT 4R-15L** – вовлечена одна общая хромосома 4, значит, унивалентная хромосома у линии Мо75 является хромосомой 4 A₁-субгенома хлопчатника.

При исследовании моносомной линии Мо67 в двух вариантах скрещиваний с линиями **TT 3R-5R** и **TT 9R-25**

была обнаружена негомологичность унивалентной хромосомы Мо67 и одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 23 бивалента плюс один унивалент и один квадриллент. В варианте скрещивания с линией **ТТ 6L-7L** в метафазе I мейоза были обнаружены 24 бивалента плюс один тривалент, которые свидетельствовали о гомологичности унивалентной хромосомы Мо67 и одной из транслоцированных хромосом у тестерной линии. Поскольку присутствие восьми хромосом специфичных микросателлитных маркеров – BNL1064, BNL2884, BNL3650, CIR203, Gh032, Gh039, Gh082 и TMB1538 – было установлено у моносомного межвидового гибрида F₁ от скрещивания Мо67 × Pima 3-79, а ранее эти маркеры были локализованы на хромосоме 6 A₁-субгенома хлопчатника, можно утверждать, что унивалентная хромосома у моносомной линии Мо67 цитогенетической коллекции НУУз является хромосомой 6 A₁-субгенома хлопчатника.

Закключение

Таким образом, использование SSR-маркеров и тестерных транслокационных линий позволило провести унифицированную идентификацию и нумерацию унивалентных хромосом у 28 анеуплоидных линий цитогенетической коллекции. Среди них были идентифицированы пять различных негомологических хромосом генома хлопчатника (хромосомы 2, 4, 6 A₁-субгенома и хромосомы 18 и 22 D₁-субгенома), а также одна телоцентрическая хромосома 11 A₁-субгенома. Двадцать два других моносомика были выявлены как дубликаты трех хромосом (хромосомы 2, 4 и 6). Наиболее часто среди идентифицированных хромосом моносомных линий встречалась хромосома 4 (18 раз), затем хромосома 2 (4 раза) и хромосома 6 (3 раза) – как в результате облучения пыльцы и тепловыми нейтронами, так и в потомствах десинаптических растений, за исключением Мо67, который возник в потомстве растения с транслокацией с десинаптическим эффектом.

Сравнительный анализ частот обнаружения моносомиков в США выявил более частую встречаемость унивалентной хромосомы 2 A-субгенома (28 раз), характеризовавшейся также более частыми воспроизводством (45 %) и вовлечением в транслокации (12 обменов) (Brown, 1978; Endrizzi et al., 1985). На более частую встречаемость хромосом 4 и 6 в качестве спонтанных унивалентных хромосом в естественных популяциях указывалось и ранее (Endrizzi et al., 1985). По-видимому, неравная частота обнаружения различных негомологичных хромосом хлопчатника в виде унивалентов может объясняться разной подверженностью центромерных районов хромосом к воздействию радиации, а также присутствием жизненно важных локусов, гемизиготное состояние которых у моносомиков приводит к их полной нежизнеспособности.

Отсутствие полной серии моносомных линий тетраплоидного хлопчатника и недостаточное по этой причине число линий с замещением отдельных хромосом сказывается на дальнейшем прогрессе в области молекулярно-генетических исследований. До настоящего времени у хлопчатника не имеется соответствия в числе групп сцепления и числе негомологичных хромосом, отсутствует хромосомная локализация многих маркерных

локусов, а также существуют различия в составлении генетических карт хромосом (Saha et al., 2015). Поэтому получение новых анеуплоидных линий тетраплоидного хлопчатника будет способствовать решению многих из перечисленных выше вопросов.

Acknowledgments

This study was supported by the Commission for Science and Technologies, Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan, Basic and Applied Research projects F-5-31 and KA-8009.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Saha S., Pepper A.E., Musaev J.A., Almatov A., Shermatov S.E., Kushanov F.N., Mavlonov G., Reddy U.K., Yu J.Z., Jenkins J.N., Kohel R.J., Abdurakimov A. Microsatellite markers associated with lint percentage trait in cotton, *Gossypium hirsutum*. Euphytica. 2007;156:141-156.
- Blenda A., Fang D.D., Rami J.F., Garsmeur O., Luo F. A high density consensus genetic map of tetraploid cotton that integrates multiple component maps through molecular marker redundancy check. PLoS ONE. 2012;7(9):e45739. DOI 10.1371/journal.pone.0045739.
- Brown M.S. The identification of chromosomes in *Gossypium hirsutum* by means of translocations. Genetics. 1965;52:430-431.
- Brown M.S. The identification of the individual chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. Proc. Beltw. Cotton Prod. Res. Conf. Dallas, January 9–11 1978. Dallas, 1978;70.
- Brown M.S. Identification of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by means of translocations. J. Hered. 1980;71(4):266-274.
- Brown M.S., Endrizzi J.E. The origin, fertility and transmission of monosomic in *Gossypium*. Amer. J. Bot. 1964;51(1):108-115.
- Edwards G.A., Brown M.S., Niles G.A., Naqi S.A. Monosomics of cotton. Crop Sci. 1980a;20(4):527-528.
- Edwards G.A., Brown M.S., Niles G.A., Naqi S.A. The frequency of spontaneous and other monosomes at Beasley laboratory, 1946 to 1979. Proc. Beltw. Cotton Prod. Res. Conf., 1980b;103-106.
- Endrizzi J.E. Use of haploids in *Gossypium barbadense* L. as a source of aneuploids. Current Science. 1966;(2):34-35.
- Endrizzi J.E., Brown M.S. Identification of monosomes for six chromosomes in *Gossypium hirsutum*. Amer. J. Botany. 1964;51:117-120.
- Endrizzi J.E., Ramsay G. Monosomes and telosomes for 18 of the 26 chromosomes of *Gossypium hirsutum*. Can. J. Genet. Cytol. 1979; 21(4):531-536.
- Endrizzi J.E., Ramsay G. Identification of ten chromosome deficiencies of cotton. Cytological identification of eight chromosomes and genetic analysis of chromosome deficiencies and marker genes. J. Hered. 1980;71(1):45-48.
- Endrizzi J.E., Ray D.T. Monosomic and monotelodisomic analysis of 34 mutant loci in cotton. J. Hered. 1991;82:53-57.
- Endrizzi J.E., Ray D.T. Mapping of the cl₁, R₁, yg₁ and Dw loci in the long arm of chromosome 16 of cotton. J. Hered. 1992;83:1-5.
- Endrizzi J.E., Turcotte E.L., Kohel R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. Adv. Genet. 1985;23:271-375.
- Galen D.F., Endrizzi J.E. Induction of monosomes and mutations in cotton by gamma irradiation of pollen. J. Hered. 1968;59(6): 343-346.
- Hoffman S.M., Yu J.Z., Grum D.S., Xiao J., Kohel R.J., Pepper A.E. Identification of 700 new microsatellite loci from cotton (*G. hirsutum* L.). J. Cotton Science. 2007;11:208-241.
- Kakani A., Saha S., Sapra V.T., Zipf A., Stelly D.M. Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene (s) in *Gossypium*. Crop Sci. 1999;39:668-673.

- Kohel R.J., Stelly D.M., Yu J. Tests of six cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutants for association with aneuploids. *J. Hered.* 2002; 93(2):130-132.
- Lacape J.M., Jacobs J., Arioli T. A new interspecific, *Gossypium hirsutum* × *G. barbadense*, RIL population: Towards a unified consensus linkage map of tetraploid cotton. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(2): 281-282. DOI 10.1007/s00122-009-1037-y.
- Liu S., Saha S., Stelly D., Burr B., Cantrel R.G. The use of cotton aneuploid for the chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *J. Hered.* 2000;91:326-332.
- Musayev D.A. Geneticheskaya kolleksiya khlopchatnika [Genetic Collection of Cotton]. Tashkent, FAN Publ., 1979. (in Russian)
- Myles E.L., Endrizzi J.E. Aneuploids induced by deficiencies of chromosome 9 and analysis of the time of nondisjunction in cotton. *Genome.* 1989;32:12-18.
- Nguyen T.B., Ciband M., Brottier P., Risterucci A.M., Lacape J.M. Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:167-176. DOI 10.1007/s00122-004-1612-1.
- Rakhmatullina E.M., Sanamyan M.F. Estimation of the efficiency of seed irradiation by thermal neutrons for inducing chromosomal aberrations in M_1 of cotton *Gossypium hirsutum*. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2007a;43(4):499-507. (in Russian)
- Rakhmatullina E.M., Sanamyan M.F. Estimation of the efficiency of seed irradiation by thermal neutrons for inducing chromosomal aberrations in M_2 of cotton *Gossypium hirsutum*. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2007b;43(5):639-646. (in Russian)
- Reddy A.S., Connell J., Pammi S., Iqbal J. Genetic mapping of cotton: isolation and polymorphism of microsatellites. *Proc. Beltw. Cotton Prod. Res. Conf., Memphis, TN, National Cotton Council of America*, 1998;485.
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M. Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) × Hawaiian cotton (*G. tomentosum* Nutt. ex Seem.) F_1 hybrid hypoaneuploid chromosome substitution series. *J. Cotton Science.* 2006;10:263-272.
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M., Manchali S., Gutierrez O.A. Hypoaneuploid chromosome substitution F_1 hybrids of *Gossypium hirsutum* L. × *G. mustelinum* Miers ex Watt. *J. Cotton Science.* 2013;17: 102-114.
- Saha S., Stelly D.M. Chromosomal location of Phosphoglucumutase 7 locus in *Gossypium hirsutum*. *J. Hered.* 1994;85:35-39.
- Saha S., Stelly D.M., Makamov A.K., Ayubov M.S., Raska D., Gutierrez O.A., Manchali S., Jenkins J.N., Deng D., Abdurakhmonov I.Y. Molecular confirmation of *Gossypium hirsutum* chromosome substitution lines. *Euphytica.* 2015;205:459-473. DOI 10.1007/s10681-015-1407-2.
- Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jr., Gutierrez O.A., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A. Effect of Chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. *J. Cotton Science.* 2004;8:162-169. DOI 10.1007/s00122-012-1965-9.
- Samora P.J., Stelly D.M., Kohel R.J. Localization and mapping of the Le_1 and Gl_2 loci of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Hered.* 1994; 85(2):152-157.
- Sanamyan M.F. Cytogenetic effect of treatment of cotton seeds with thermal neutrons. *Tsitologiya i genetika = Cytology and Genetics.* 2003a;3:49-54. (in Russian)
- Sanamyan M.F. Evaluation of the effect of pollen irradiation on karyotype variability in M_1 cotton plants. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2003b;39(7):947-955. (in Russian)
- Sanamyan M.F. Evaluation of the effect of pollen irradiation on karyotype variability in M_2 cotton plants. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2003c;39(8):1081-1090. (in Russian)
- Sanamyan M.F. Cytogenetic characterization of cotton haploid. *Sbornik statey, posvyashchenny 80-letiyu akademika A.A. Abdullaeva "Fizaning duneviy khilma-khilligi genofondi fundamental va amaliy tadkikotlar asosi"* [Coll. The article is devoted to 80th anniversary of Acad. A.A. Abdullayev "Cotton in view of fundamental and applied studies of gene diversity in the world"]. Tashkent, 2010;121-124. (in Uzbek)
- Sanamyan M.F., Musayev D.A. Detection and cytological study of aneuploid and euploid plants with chromosome translocations in cotton *Gossypium hirsutum* L. *Genetika = Genetics* (Moscow). 1990;26(3):506-515. (in Russian)
- Sanamyan M.F., Petlyakova J.E., Musaev D.A. The development and a cytogenetic study of monosomics of *Gossypium hirsutum* L. *Biologia Plantarum.* 2000;43:193-197.
- Sanamyan M.F., Petlyakova J., Rakhmatullina E.M., Sharipova E. Ch. 10. Cytogenetic collection of Uzbekistan. (Ed. I.Y. Abdurakhmonov) *World Cotton Germplasm Resources. Croatia: InTech*, 2014;247-287. DOI 10.5772/56978.
- Sanamyan M.F., Petlyakova J.E., Sharipova E.A., Abdurakhmonov I.Y. Cytogenetic characteristics of new monosomic stocks of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetics Research International.* 2011;12. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/273642>.
- Sears E.R. Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma.* 1952;4:535-550.
- Sears E.R. The aneuploids of common wheat. *Research Bul. Univ. Missouri, College Agricul., Agricul. Exper. Station.* 1954;(572): 1-58.
- Stelly D.M. Localization of the Le_2 locus of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Hered.* 1990;81(3):193-197.
- White T.G., Endrizzi J.R. Tests for the association of marker loci with chromosomes in *Gossypium hirsutum* L. by the use of aneuploids. *Genetics.* 1965;51:605-612.
- Yu J.Z., Kohel R.J., Fang D.D., Cho J., Van Deynze A., Ulloa M., Hoffman S.M., Pepper A.E., Stelly D.M., Jenkins J.N., Saha S., Kumpatla S.P., Shah M.R., Hugie W.V., Percy R.G. A high-density simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism genetic map of the tetraploid cotton genome. *G3 (Bethesda).* 2012;2:43-58. DOI 10.1534/g3.111.001552.



Наследование белковых маркеров в ряду поколений межвидовых гибридов хлопчатника

Ш. Юнусханов , З.А. Абдуразакова

Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан, Ташкентская область, Узбекистан

Представлены результаты изучения наследования белковых маркеров в разных поколениях межвидовых гибридов хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. × *G. barbadense* L. и *G. barbadense* L. × *G. hirsutum* L. При выведении этих гибридов вид *G. hirsutum* был представлен карликовыми растениями, полученными вследствие мутации, индуцированной ранее гамма-излучением, а вид *G. barbadense* – сортом С-6037. Растения вида *G. hirsutum* имели белковый маркер Н-0,13, а у растений вида *G. barbadense* гомологичный маркер был представлен белком В-0,18. Более ранними исследованиями установлено, что в межвидовых скрещиваниях эти маркеры проявляют себя как аллели одного локуса. Это позволило использовать данные маркеры для анализа соотношений фенотипических классов в ряду поколений межвидовых гибридов, включая F_2 , F_9 и F_{10} . При проведении исследований растения, содержащие только один тип белка (Н-0,13 или В-0,18), рассматривали как гомозиготы по соответствующему гену, а растения, содержащие оба белка (Н-0,13 и В-0,18), – как гетерозиготы. У ряда полиморфных по указанным белкам потомств наблюдалось достоверное изменение соотношения фенотипических классов, проявлявшееся как смещение в сторону увеличения или уменьшения доли какого-либо гомозиготного фенотипического класса либо как достоверное увеличение или уменьшение доли гетерозиготного класса. Электрофоретический состав белков семян исследуемых образцов хлопчатника оставался неизменным до девятого поколения гибридов, но в десятом поколении некоторые гетерозиготные растения давали потомство, в семенах которых отсутствовал белок с электрофоретической подвижностью 0,70. Такие растения принадлежали гомозиготному фенотипическому классу, у которого выявляется маркер Н-0,13.

Ключевые слова: хлопчатник; *Gossypium hirsutum* L.; *G. barbadense* L.; карликовая форма; реципрокные гибриды; белковые маркеры.

Inheritance of protein markers in the succession of generations of interspecific hybrids of cotton

Sh. Yunuskhonov , Z. Abdurazakova

Institute of Genetics and Plant Experimental Biology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent region, Uzbekistan

This paper presents the results of studying the inheritance of protein markers in different generations of interspecific hybrids of cotton *Gossypium hirsutum* L. × *G. barbadense* L. and *G. barbadense* L. × *G. hirsutum* L. While these hybrids were in development, the species *G. hirsutum* was represented by dwarf plants and the species *G. barbadense*, by variety C-6037 plants. *G. hirsutum* plants had protein marker H-0.13 and *G. barbadense* plants had the homologous marker, protein B-0.18. Previous studies demonstrated that in interspecific crosses these markers behave as alleles of the same locus. This allowed these markers to be used for analysis of the ratios of phenotypic classes in the succession of generations of interspecific hybrids, including F_2 , F_9 and F_{10} . In these studies, the plants with only one type of protein (H-0.13 or B-0.18) were regarded as homozygous for the corresponding gene, while plants with both proteins (H-0.13 and B-0.18), as heterozygous. Some polymorphic progeny showed a significant shift in the ratios of phenotypic classes. These changes were observed as an increased or a decreased share of a particular phenotypic class, or as a significant increase or decrease in the proportion of the heterozygotes. The electrophoretic protein composition of cotton seed samples remained unchanged until the tenth generation of hybrids, but in the tenth generation, some heterozygous plants gave offspring, the seeds of which lacked protein with an electrophoretic mobility of 0.70. Plants in which this protein was absent belonged to the homozygous phenotypic class with marker H-0.13.

Key words: cotton; *Gossypium hirsutum* L.; *G. barbadense* L.; dwarf form; reciprocal hybrids; protein markers.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Юнусханов Ш., Абдуразакова З.А. Наследование белковых маркеров в ряду поколений межвидовых гибридов хлопчатника. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):653-657. DOI 10.18699/VJ16.160

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yunuskhonov Sh., Abdurazakova Z. Inheritance of protein markers in the succession of generations of interspecific hybrids of cotton. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):653-657. DOI 10.18699/VJ16.160

ORIGINAL ARTICLE

Received 11.03.2015 r.

Accepted for publication 24.02.2016 r.

© AUTHORS, 2016

e-mail: yushavkat@mail.ru

Род Хлопчатник (*Gossypium*) включает в себя около 50 видов, в число которых входят диплоидные виды и естественные амфидиплоиды (Fryxell, 1984). Мировое производство хлопка базируется в основном на культивировании двух амфидиплоидных видов – *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L. На их долю приходится соответственно около 90 и 5 % всего производства хлопкового волокна (Wendel et al., 1992).

В настоящее время актуальны исследования, посвященные выявлению молекулярных маркеров, наследование которых коррелирует с наследованием хозяйственно ценных признаков растений. С этой целью используют полиморфизм фрагментов ДНК (Lazo et al., 1994; Straub et al., 1996; Ulloa, Meredith, 2000), а также полиморфизм белков и изоферментов (Левитес, 1986; Глазко, Созинов, 1993; Фарбер, 1994). Следует отметить, что методы белковых и изоферментных маркеров остаются самыми доступными и более экономичными по сравнению с методами анализа фрагментов ДНК. В результате сравнительного исследования белков семян различных сортов культивируемого хлопчатника выявлены водорастворимые белковые маркеры, обозначенные символами Н-0,13 у вида *G. hirsutum* и В-0,18 у вида *G. barbadense*, а также система буферорастворимой фракции белков АС и ВД (Юнусханов, Ибрагимов, 1984, 1988; Юнусханов, Абдуразакова, 2009; Юнусханов и др., 2009). Контролируемые моногенно и проявляющие себя в межвидовых скрещиваниях как аллельные варианты (Юнусханов, Ибрагимов, 1984, 1988), эти белки служат удобными биохимическими маркерами в различных генетических экспериментах, в том числе при проведении исследований, направленных на изучение взаимосвязи разных хозяйственно ценных и морфобиологических признаков. В то же время использование белковых и изоферментных маркеров имеет важное самостоятельное значение в изучении функционирования растительного генома.

У хлопчатника среди гибридов M_2 , полученных путем опыления цветков растений сорта С-4727 пыльцой сорта Ташкент-3 средневолокнистого вида *G. hirsutum*, облученной гамма-лучами Co^{60} в дозе 1,0 кР, была выделена форма, характеризующаяся карликовостью (Мухамеджанова, 1979). Признак карликовости оказался постоянно расщепляющимся в отношении 1 : 2 (нормальные растения : карликовые растения). На основании генетического анализа сделано заключение о том, что данная линия содержит летальный ген *Leidw*, гетерозиготное состояние которого определяет признак карликовости растений, а гомозиготные по данному гену формы погибают на ранних стадиях развития проростков (Абзалов, 2008).

Цель настоящего исследования – изучение наследования белковых маркеров Н-0,13 и В-0,18 в ряду поколений реципрочных межвидовых гибридов, полученных скрещиванием карликовой формы вида *G. hirsutum* с сортом С-6037 вида *G. barbadense*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили семена различных поколений реципрочных гибридов, полученных скрещиванием линии Карлик средневолокнистого вида *G. hirsutum* с сортом С-6037 тонковолокнистого вида *G. barbadense*.

Взятые в скрещивание родительские формы были выращены из семян растений, самоопыленных в течение трех поколений. С целью выделения высокоизогенных линий хлопчатника, различающихся только по белковым маркерам Н-0,13 и В-0,18, каждый год из гибридных популяций Карлик × С-6037 и С-6037 × Карлик отбирали семена от растений, гетерозиготных по белковым маркерам. Эти семена высевали для получения следующего поколения, в котором также для получения потомств использовали только гетерозиготные растения. Следует отметить, что семена из каждого поколения растений отбирали из самоопыленных коробочек хлопчатника.

Подготовку семян для выделения белков и электрофоретический анализ полученных экстрактов проводили по методам, описанным ранее (Юнусханов, Ибрагимов, 1984). Результаты расщепления анализируемых потомств по белковым маркерам обработаны статистически с использованием критерия χ^2 (Гершензон, 1979).

Результаты и обсуждение

Соотношения гомозиготных (Н-0,13 и В-0,18) и гетерозиготных (Н-0,13 + В-0,18) фенотипов в потомствах F_2 реципрочных гибридов представлены в табл. 1. Видно, что в гибридной комбинации С-6037 × Карлик соотношение фенотипов резко отличается от менделевского соотношения 1 : 2 : 1. Ранее при изучении различных комбинаций межвидовых гибридов было показано, что белковые маркеры Н-0,13 и В-0,18 являются аллельными и их наследование имеет кодоминантный и моногенный характер (Юнусханов, Ибрагимов, 1984, 1988).

Полученные в настоящей работе результаты могут быть обусловлены следующими возможными событиями: стерильностью растений, содержащих определенный набор белковых маркеров; позднеспелостью определенных генотипов, приводящей к недополучению урожая от этих растений; летальностью тех или других генотипов, контролирующей образование этих белковых маркеров. Однако экспериментальные работы с данными гибридами показали, что стерильные растения и растения с позднеспелыми коробочками составляли небольшую долю – 5 % от общего количества растений.

Наши результаты хорошо согласуются с известными данными, полученными на других объектах. В большом количестве работ обсуждается смещение расщепления у растений, обнаруженное при использовании в генетических исследованиях молекулярных маркеров (Yamagishi et al., 1996; Maheswaran et al., 1997; Голоенко, Давыденко, 2005). При изучении наследования ядерных генов ячменя, детерминирующих различные морфологические маркерные признаки растений, в гибридных популяциях обнаружено изменение менделевского моногенного наследования по девяти маркерным генам в зависимости от направления скрещивания (Голоенко и др., 2002). Нарушение частоты аллелей в потомствах растений может возникать по разным физиологическим и генетическим причинам (Голоенко, Давыденко, 2005). Чаще всего смещение расщепления появляется по причине отбора мужских гамет, вызванного влиянием среды или различной конкурентной способностью генетически вариабельной пыльцы. В гибридной популяции от межвидовых

Table 1. Segregation for marker proteins in F₂ cotton plants from reciprocal interspecies crosses

Hybrid	Number of plants with marker proteins			$\chi^2(1:2:1)$	<i>p</i>
	N-0.13	N-0.13+V-0.18	V-0.18		
C-6037 × Karlik	37	33	13	17.361	< 0.001
Karlik × C-6037	18	18	16	5.076	> 0.05

Table 2. Segregation for the presence of proteins N-0.13 and V-0.18 in seed progeny F₉ of reciprocal cotton interspecies hybrids

Line	Number of plants with marker proteins			$\chi^2(1:2:1)$	p
	N-0.13	N-0.13+V-0.18	V-0.18		
F ₉ C-6037 × Karlik					
LBM-6	23	26	20	4.449	> 0.05
LBM-7	29	45	30	1.904	> 0.05
LBM-8	30	40	38	8.444	< 0.05
LBM-9	19	30	48	31.454	< 0.001
F ₉ Karlik × C-6037					
LBM-10	14	9	14	9.757	< 0.01
LBM-11	23	51	18	1.630	> 0.05
LBM-12	25	45	17	1.575	> 0.05
LBM-13	16	44	18	1.385	> 0.05
LBM-15	18	33	33	9.214	< 0.01
LBM-16	15	18	14	2.617	> 0.05

Table 3. Segregation of individual F₉ plants of reciprocal cotton hybrids for the presence of proteins N-0.13 and V-0.18

Line	Number of plants with marker proteins			$\chi^2(1:2:1)$	<i>p</i>
	N-0.13	N-0.13 + B-0.18	V-0.18		
F ₉ C-6037 × Karlik					
LBM-6	19	66	15	10.56	<0.01
LBM-8	30	48	22	1.44	>0.05
F ₉ Karlik × C-6037					
LBM-10	21	89	40	10.04	<0.01

скрещиваний *Lycopersicon esculentum* × *L. chmielewskii* нарушение расщепления было обнаружено по 68,5 % из 70 изученных признаков (Paterson et al., 1988).

Однако наряду с внешними воздействиями огромное влияние на функционирование генома могут оказывать те изменения, которые возникают в геноме растений при длительном использовании определенных схем принудительного размножения (Шумный, Похмельных, 1999). В связи с этим было интересно проанализировать соотношения фенотипических классов в последующих поколениях размножения гетерозиготных растений межвидовых гибридов, в частности в F₉ и F₁₀. Полученные результаты представлены в табл. 2–4.

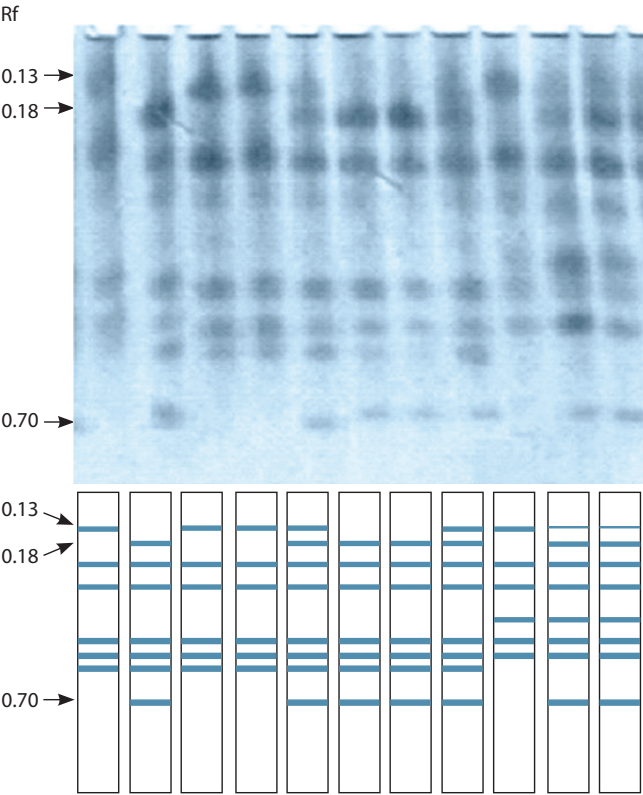
Расщепление в потомствах рецiproкных гибридных гетерозиготных растений девятого поколения по белко-

вым маркерам различное. Из четырех изученных линий гибрида F₉ C-6037 × Карлик две линии дают нормальное и две – аномальное расщепление, а из шести линий гибрида Карлик × C-6037 четыре линии дают нормальное и две – аномальное расщепление (см. табл. 2). Аномальность расщепления заключалась в достоверном смещении в сторону увеличения или уменьшения доли какого-либо гомозиготного фенотипического класса либо в достоверном увеличении или уменьшении доли гетерозиготного класса.

В табл. 3 представлены результаты анализа семенного потомства девятого поколения от трех отдельных гетерозиготных по белковым маркерам растений, отобранных из популяции гетерозигот, дающих аномальное расщепление в потомстве. При этом одно растение дает семенное потом-

Table 4. Segregation of F₁₀ plants of reciprocal cotton hybrids for the presence of proteins N-0.13 and V-0.18 in seeds

Line	Number of plants with marker proteins			$\chi^2(1:2:1)$	p
	N-0.13	N-0.13+V-0.18	V-0.18		
F ₁₀ C-6037 × Karlik					
LBM-17	13	39	19	1.704	>0.05
LBM-18	2	14	4	3.60	>0.05
F ₁₀ Karlik × C-6037					
LBM-19	42	32	12	26.558	<0.001
LBM-20	37	75	43	0.626	>0.05
LBM-21	7	47	11	13.431	<0.01



Electrophoretic image and schematic presentation of the electrophoresis of buffer-soluble proteins from seeds of heterozygous cotton plants (F₁₀ C-6037 × Karlik).

ство с нормальным расщеплением, а два других растения дают потомство с аномальным расщеплением. Приведенные в табл. 1–3 данные свидетельствуют о том, что отклонения от нормального расщепления проявляются еще на стадии семян и могут быть обусловлены избирательной трансмиссией мужских или женских гамет либо отбором мужских гамет вследствие различной конкурентной способности генетически вариабельной пыльцы. Электрофоретический состав белков семян исследуемых образцов хлопчатника оставался неизменным до десятого поколения. В десятом поколении некоторые гетерозиготные растения давали потомство, в семенах

которых отсутствовал один из белков, а именно: белок с электрофоретической подвижностью 0,70. Образцы, у которых отсутствовал этот белок, принадлежали к фенотипическому классу, содержащему белковый маркер N-0,13 (см. рисунок). Утрата белкового компонента N-0,70 была замечена и в семенах, полученных после нескольких поколений самоопыления растений хлопчатника сорта Ташкент 1. Подобное отклонение наблюдалось с частотой менее 0,1 % (Юнусханов, Ибрагимов, 1988). В работе Н.Н. Анисимовой и др. (2009) показано, что геном интрогрессивных линий подсолнечника *Helianthus annuus* характеризуется нестабильностью даже после многолетнего инбридинга (в поколениях F₈–F₁₂). Обнаружено изменение характера экспрессии локуса гелиантинина HelC: у некоторых фенотипов наблюдалось отсутствие одной из субъединиц гелиантинина. Авторы пришли к заключению, что нестабильность генома подсолнечника, проявляющаяся на фенотипических и молекулярных уровнях, может быть обусловлена активностью мобильных генетических элементов. В десятом поколении межвидовых гибридов также выявлялись аномальные соотношения фенотипических классов. При исследовании расщепления двух гетерозиготных по белковым маркерам линий гибрида F₁₀ C-6037 × Карлик и трех линий гибрида F₁₀ Карлик × C-6037 оказалось, что у двух линий гибрида F₁₀ Карлик × C-6037 наблюдаются отклонения от менделевского расщепления (см. табл. 4). Выявленное аномальное расщепление по белковым маркерам имеет разнонаправленный характер. В одних случаях смещение идет в сторону увеличения или уменьшения генотипов с одним типом белкового маркера, а в других – наблюдаются изменения доли гетерозиготной формы, содержащей оба белковых маркера. Полученные в данной работе результаты с использованием реципрокных гибридов свидетельствуют о том, что аномальное расщепление потомств по моногенно контролируемым белковым маркерам не является следствием цитоплазматическо-ядерных отношений, поскольку в обоих вариантах смещение расщепления наблюдается с одинаковой вероятностью.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

References

- Abzalov M.F. Vzaimodeystvie genov u khlopchatnika *G. hirsutum* L. [The Interaction of Genes in Cotton *G. hirsutum* L.] Tashkent, Fan Publ., 2008. (in Russian)
- Anisimova I.N., Tumanova L.G., Gavrilova V.A., Dyagileva A.V., Pasha L.I., Mitin V.A., Timofeyeva G.I. Genomic instability in sunflower interspecific hybrids. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2009; 45(8):1067-1077. (in Russian)
- Farber S.P. 12S1-globulins of seeds in the identification of cabbage varieties. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*, 1994;5:8-10. (in Russian)
- Fryxell P.A. Taxonomy and germplasm resources. (Eds. R.J. Kohel, C.F. Lewis). *Cotton. Agron. Ser. 24. Am. Soc. Agron. Madison, WI*, 1984;27-57.
- Gershenzon S.M. Osnovy sovremennoy genetiki [The Foundations of Modern Genetics]. Kiev: Nauk. Dumka Publ., 1979. (in Russian)
- Glazko V.I., Sozinov M.A. *Genetika izofermentov zhivotnykh i rasteniy* [Genetics of isoenzymes of animals and plants]. Kiev, 1993;420-437. (in Russian)
- Goloenko I.M., Davydenko O.G., Shimkevich A.M. Violation of the segregation of nuclear marker genes in allo- and isoplasmic barley lines. *Genetika = Genetics* (Moscow). 2002;38(7):944-949. (in Russian)
- Goloenko I.M., Davydenko O.G. Violation of Mendelian segregation. The effects of cytoplasmic organelle genomes. *Tsitologiya i genetika = Cytology and Genetics* (Kiev). 2005;1:71-81. (in Russian)
- Lazo G.R., Park J., Kohel R.J. Identification of RAPD markers linked to fiber straight in *G. hirsutum* and *G. barbadense* crosses. *Biochemistry of cotton workshop*, Sept. 28-30, 1994;1-10.
- Levites E.V. *Genetika izofermentov rasteniy* [Genetics of Plant Isoenzymes]. Novosibirsk, 1986. (in Russian)
- Maheswaran M., Subudhi P., Nandi S., Xu J.C., Parco A., Yang D.C., Huang N. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* 1997;94:39-45.
- Mukhamedjanova D. Nasledovanie priznaka karlikovosti u khlopchatnika pri obluchenii pyltzy [Inheritance of dwarfism in cotton after pollen irradiation]. *Genetika i tsitoembriologiya khlopchatnika* [Genetics and Cytoembryology of Cotton]. Tashkent, Fan Publ., 1979; 78-81. (in Russian)
- Paterson A.H., Lander E.S., Hewitt J.D., Peterson S., Lincoln S.E., Tanksley S.D. Resolution of quantitative trait into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*. 1988;35:721.
- Shumny V.K., Pokhmelnikh G.A. Heterochromatic chromosomal regions and protandry in maize. *Genetika = Genetics* (Moscow). 1999; 5:641-649. (in Russian)
- Straub J.T., Serguen F.S., Gupta M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Science*. 1996; 31(5):729-741.
- Ulloa M., Meredith W.R. Jr. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an interspecific population. *J. Cotton Science*. 2000;4:161-170.
- Wendel J.F., Brubaker C.L., Percival A.E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. *Am. J. Bot.* 1992; 79:1291-1310.
- Yamagishi M., Yano M., Fukuta Y., Fukui K., Otani M., Shimada T. Distorted segregation of RFLP markers in regenerated plants derived from anther culture of an F₁ hybrid of rice. *Genes and Genet. Syst.* 1996;71(1):37-41.
- Yunuskhonov Sh., Abdurazakova Z.L. Isogenic lines for marker proteins N-0.13 and V-0.18. *Uzbekskiy biologicheskiy zhurnal = Uzbek biological journal*. 2009;1:67-71. (in Russian)
- Yunuskhonov Sh., Abdurazakova Z.L., Kurbanbaev I.D. Employment of marker proteins for raise of cotton isogenic lines. *Doklady Akademii nauk Respubliki Uzbekistan = Report of Academy of Sciences Republic of Uzbekistan*. 2009;1:66-68. (in Russian)
- Yunuskhonov S., Ibragimov A.P. Identification of protein markers in seeds of cotton species *G. hirsutum* L. and *G. barbadense* L. and study of the linkage of their inheritance to some characters. *Genetika = Genetics* (Moscow). 1984;20(6):989-997. (in Russian)
- Yunuskhonov S., Ibragimov A.P. Belki khlopchatnika [Proteins of cotton]. Tashkent, Fan Publ., 1988. (in Russian)

Межвидовые гибриды некоторых восточноазиатских представителей рода *Chrysanthemum* L. и анализ их устойчивости

А.И. Недолужко

Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Хризантема садовая (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) – востребованная осеннецветущая культура для садово-паркового оформления и использования на срез, отличается продолжительным, обильным и красочным цветением. Отсутствие зимостойких и адекватных по срокам цветения сортов, слабая устойчивость к патогенной микробиоте ограничивают ее распространение в большинстве регионов России. Актуальным является создание нового селекционного материала на основе искусственной межвидовой гибридизации, способной совместить ценные признаки разных видов *Chrysanthemum* в одном организме. Проведены прямые и обратные скрещивания между видами маньчжурской (*C. chanetii* H. Lév., *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. maximoviczii* Kom., *C. naktongense* Nakai, *C. zawadskii* subsp. *acutilobum* (DC.) Kitag., *C. tenuisectum* Kitag., *C. zawadskii* subsp. *latilobum* (Maxim.) Kitag., *C. leiophyllum* Nakai), монгольско-сибирской (*C. mongolicum* Y. Ling, *C. zawadskii* Herbich) флоры и межвидовыми гибридными формами с привлечением субтропических представителей *Chrysanthemum*. Скрещивание видов с одинаковым числом хромосом (гексаплоид $\times$ гексаплоид, $2n = 54$ и тетраплоид $\times$ тетраплоид, $2n = 36$) в прямом и обратном направлениях проходило без всяких затруднений. Хорошая совместимость отмечена при гибридизации тетраплоидных и гексаплоидных родителей. Диплоиды ($2n = 18$) не всегда совместимы между собой и частично совместимы с гексаплоидами. Межвидовые гибриды в первом семенном поколении характеризовались фенотипическим единообразием с промежуточным наследованием либо преобладанием признаков высокоплоидного родителя, отличались гибридной мощностью, интенсивностью порослеобразования и комплексом адаптивных качеств. Получены сложные межвидовые гибриды в комбинациях скрещивания, состоящих из трех разных компонентов. Отобранные декоративные межвидовые и межгибридные формы перспективны для озеленения и служат комплексными источниками адаптивности для получения отечественных сортов хризантемы садовой.

Ключевые слова: *Chrysanthemum*; многолетние восточноазиатские виды; искусственная межвидовая гибридизация; адаптивные признаки; российский Дальний Восток.

Interspecific hybrids of some East Asian representatives of the genus *Chrysanthemum* L. and analysis of their sustainability

A.I. Nedoluzhko

Botanical Garden-Institute, Far East Branch, Russian Academy Sciences, Vladivostok, Russia

The garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) is a highly demanded autumn flowering culture for parks and gardens and as cut flowers and has long, abundant and colorful flowering. The lack of winter-hardy and season-adequate flowering cultivars and poor resistance to diseases limit its distribution in most regions of Russia. The development of new plant-breeding material by artificial interspecific hybridization able to combine valuable traits of different *Chrysanthemum* species in a single organism is therefore of importance. Reciprocal crossing has been conducted between the species of the Manchurian (*C. chanetii* H. Lév., *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. maximoviczii* Kom., *C. naktongense* Nakai, *C. zawadskii* subsp. *acutilobum* (DC.) Kitag., *C. tenuisectum* Kitag., *C. zawadskii* subsp. *latilobum* (Maxim.) Kitag., *C. leiophyllum* Nakai), Mongolian-Siberian (*C. mongolicum* Y. Ling, *C. zawadskii* Herbich) flora and interspecific hybrid forms with the involvement of subtropical *Chrysanthemum* species. Crossing and backcrossing of species with identical numbers of chromosomes (hexaploid $\times$ hexaploid, $2n = 54$ and tetraploid $\times$ tetraploid, $2n = 36$) were easy. Tetraploids $\times$ hexaploids showed good compatibility. Diploids ($2n = 18$) are not always compatible between themselves and are partly compatible with hexaploids. Interspecific hybrids in the first generation (F_1) were characterized by phenotypic uniformity with intermediate inheritance or predominance of traits of the high-ploidy parent and differed in hybrid power, intensity of emergent rhizomes and complex of adaptive qualities. Multicomponent interspecific hybrids have been obtained from combinations of crossing, consisting of three different components. The selected highly decorative interspecific and multicomponent forms have promise for planting of greenery and serve as complex sources of adaptiveness for the development of garden chrysanthemum native to Russia.

Key words: *Chrysanthemum*; perennial East Asian species; artificial interspecific hybridization; adaptive traits; Russian Far East.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Недолужко А.И. Межвидовые гибриды некоторых восточноазиатских представителей рода *Chrysanthemum* L. и анализ их устойчивости. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):658-665. DOI 10.18699/VJ16.152

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nedoluzhko A.I. Interspecific hybrids of some East Asian representatives of the genus *Chrysanthemum* L. and analysis of their sustainability. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):658-665. DOI 10.18699/VJ16.152

ORIGINAL ARTICLE

Received 12.01.2015

Accepted for publication 26.01.2016

© AUTHOR, 2016

Виды рода *Chrysanthemum* L. относятся к сем. Asteraceae Dumort., трибе Anthemideae Cass. Этот род объединяет около 40 таксонов многолетних растений (Soreng, Cope, 1991; Bremer, Humphries, 1993; Камелин, 2000; Oberprieler et al., 2007), произрастающих в Восточной Азии и являющихся близкими родичами цветочной культуры – хризантемы садовой (*C. morifolium* Ramat.). Существующие сорта хризантемы садовой уступают природным видам *Chrysanthemum* по зимостойкости, выносливости к иссушению, устойчивости к патогенам. Для получения адаптивных гибридов и сортов перспективно применение межвидовой гибридизации: создание декоративных форм на основе генетического материала дикорастущих видов, обладающих комплексной устойчивостью к различным неблагоприятным факторам внешней среды.

Адаптивная селекция хризантемы садовой в России только начинает развиваться, ее успешность зависит от привлечения нового исходного материала, поиска и создания источников и доноров хозяйственно ценных признаков. Ранее работы по выделению межвидовых гибридов проводились в Китае (Chen, 1985; Wang, Chen, 1990), Японии (Fukai et al., 2004) и России (Павлова, 2011). Литературные данные по привлечению в межвидовую гибридизацию представителей рода *Chrysanthemum* флоры Дальнего Востока России, за исключением *C. chanetii* (Chen, 1985; Wang, Chen, 1990), нам неизвестны.

Согласно В.Ю. Баркалову (2006), на юге российского Дальнего Востока произрастают восемь видов рода *Chrysanthemum*: *C. chanetii* H. Lév., *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. maximoviczii* Kom., *C. mongolicum* Y. Ling, *C. naktongense* Nakai, *C. sichotense* (Tzvelev) Vorosch., *C. weyrichii* Miyabe et T. Miyake, *C. zawadskii* Herbach. Эти виды (кроме *C. zawadskii*) представлены изолированными малочисленными популяциями, встречающимися только на юге Приморского края, а три вида – *C. chanetii*, *C. sichotense*, *C. maximoviczii* – являются редкими (Харкевич, Качура, 1981; Красная книга..., 2008). Прошедшие длительную эволюцию в экстремальных климатических условиях, дальневосточные виды *Chrysanthemum* обладают ценными признаками – выносливостью к иссушению и низким зимним температурам, устойчивостью к фитопатогенам. Привлечение этих видов в межвидовую гибридизацию позволит получить селекционный материал для создания адаптивных сортов хризантемы садовой.

Многолетние восточноазиатские виды рода *Chrysanthemum* образуют полиплоидный ряд от диплоидов ($2n = 18$) до декаплоидов ($2n = 90$) с базовым числом хромосом $n = 9$ (Shimotomai, Takemoto, 1940; Dowrick, 1952; Tanaka, Watanabe, 1972; Watanabe, 1977; Tanaka et al., 1989; Oberprieler et al., 2007). В результате скрещиваний видов *Chrysanthemum* с разным уровнем ploидности получены жизнеспособные гибриды с хромосомными числами родителей $2n = 36$ и 72 (Kaneko, 1961; Fukai et al., 2004), $2n = 36$ и 54 (Fukai et al., 2004; Sun et al., 2010), $2n = 54$ и 90 (Jong, Rademaker, 1989), $2n = 54$ и 72 (Douzono, Ikeda, 1998). Трудности возникали при гибридизации диплоидов ($2n = 18$) с тетраплоидами ($2n = 36$), гексаплоидами ($2n = 54$), декаплоидами ($2n = 90$) (Kaneko, 1961; Dai, Chen, 1996; Li et al., 2008), а также октоплоидов ($2n = 72$)

между собой (Fukai et al., 2004). Большинство видов с одинаковой ploидностью способны скрещиваться в прямом и обратном направлениях с образованием жизнеспособного потомства (Dai, Chen, 1996; Li et al., 2008). В результате межвидовых скрещиваний *C. vestitum* Nakai, *C. indicum* L., *C. zawadskii* Herbach, *C. lavandulifolium* Makino, *C. nankingense* Hand.-Mazz., *C. chanetii* H. Lév. китайскими исследователями получены декоративные почвопокровные формы, устойчивые к холоду, засухе, засоленным почвам, выносливые в условиях промышленного загрязнения (Wang, Chen, 1990; Chen et al., 1995). На основе японских видов *C. pacificum* Nakai и *C. shiwogiku* Kitam. отобраны межвидовые гибриды, пригодные на срезку и устойчивые к листовому минеру и белой ржавчине (Jong, Rademaker, 1989; Douzono, Ikeda, 1998).

Для получения нового селекционного материала мы провели серию межвидовых и межгибридных скрещиваний представителей рода *Chrysanthemum* маньчжурской и монгольско-сибирской флоры (*C. chanetii* H. Lév. 1911, Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 9: 450; *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, 1940, J. Jap. Bot. 16, 2: 74; *C. maximoviczii* Kom. 1916, Изв. Петерб. бот. сада, 16: 179; *C. mongolicum* Y. Ling, 1935, Contr. Inst. Bot. Natl. Acad. Peiping. 3: 463; *C. naktongense* Nakai, 1909, Bot. Mag. (Tokyo), 23: 186; *C. zawadskii* Herbach, 1831, Addit. Fl. Galic.: 44; *C. zawadskii* subsp. *acutibulum* (DC.) Kitag. 1939, Rep. Inst. Sci. Res. Manchoukuo, 3, 2: 444 (Lin. Fl. Manshur.); *C. tenuisectum* Kitag. 1942, Rep. Inst. Sci. Res., Manchoukuo, 6: 129; *C. zawadskii* subsp. *latilobum* (Maxim.) Kitag. 1939, l. s.: 444; *C. leiophyllum* Nakai, 1921, Bot. Mag. (Tokyo), 35: 147) с привлечением субтропических видов из Китая (*C. indicum* L. 1753, Sp. Pl. 2: 889; *C. boreale* Makino, 1909, Bot. Mag. (Tokyo), 23: 20) и Японии (*C. pacificum* Nakai, 1928, Bot. Mag. (Tokyo), 42: 462).

Цель настоящей работы – получение межвидовых гибридов рода *Chrysanthemum*, оценка и отбор комплексных источников адаптивности для селекции хризантемы садовой.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие аборигенные представители *C. naktongense* Nakai, *C. chanetii* H. Lév., *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. maximoviczii* Kom., *C. zawadskii* Herbach, выращенные из семян, собранных автором в природных местообитаниях (Приморский край, Амурская область); *C. mongolicum* Y. Ling, *C. indicum* L., *C. pacificum* Nakai, *C. boreale* Makino, полученные из семян, любезно предоставленных А.А. Тараном (Сахалинский филиал Ботанического сада-института ДВО РАН), японскими и китайскими коллегами (К. Кондо, Сунь Ян) и *C. zawadskii* subsp. *acutibulum* (DC.) Kitag., *C. tenuisectum* Kitag., *C. zawadskii* subsp. *latilobum* (Maxim.) Kitag., *C. leiophyllum* Nakai, доставленные Р.В. Дудкиным из Кореи в виде зеленых черенков (табл. 1).

Образцы для исследования были выращены в Ботаническом саду-институте ДВО РАН (БСИ) в 1998–2012 гг. В различных комбинациях скрещивания использовали только определенные растения в каждой популяции, имеющие фертильную пыльцу и хорошую завязываемость семян при свободном опылении (Недолужко и др., 2002). Гибридизацию (с предварительной изоляцией)

Table 1. Species of the genus *Chrysanthemum* used in hybridization

Species	Sampling locality	Chromosome number	
		according to Nedoluzhko	data from the literature
<i>C. nakdongense</i> Nakai	Primorsky Krai, Khasan raion, near Telyakovskiy Bay, 42°35'43.0"N, 131°12'26"E, 162 m A.S.L.	2n = 36	2n = 36 (Probatova, Sokolovskaya, 1988) Described as <i>Dendranthema nakdongense</i> (Nakai), Tzvel. 1961, Flora of the USSR, vol. 26: 375
<i>C. chanetii</i> Lév.	Primorsky Krai, Khasan raion, near Posyet Settlement, 42°34'67.9"N, 130°47'61.7"E, 219 m A.S.L.	2n = 18	2n = 18 (Sokolovskaya et al., 1985) Described as <i>D. erubescens</i> (Stapf), Tzvel. 1961, Flora of the USSR, vol. 26: 374 2n = 36, 54 (Wang et al., 1991) Described as <i>D. chanetii</i> (H. Lév.) Shih, 1980, Bull. Bot. Lab. North-East. Forest. Inst., 6: 3
<i>C. coreanum</i> (H. Lév. et Vaniot) Nakai	Primorsky Krai, Lazo raion, coast of Kievka Bay, 42°49'46.1"N, 133°42'74.0"E, 72 m A.S.L.	2n = 54	2n = 36 (Probatova, Sokolovskaya, 1990)
<i>C. maximoviczii</i> Kom.	Partizanskiy raion, Chandalaz Range	2n = 54	2n = 54 (Zhmyleva, Kondo, 2006)
<i>C. zawadskii</i> Herbach	Amur oblast, near the City of Blagoveshchensk, Mukhinka stow, 50°32'54.6"N, 127°38'28.6"E, 223 m A.S.L.	–	2n = 54 (Zhmyleva, Kondo, 2006)
<i>C. leiophyllum</i> Nakai	Korean Peninsula	2n = 36	–
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>latilobum</i> (Maxim.) Kitag.	Korean Peninsula	2n = 54	2n = 54 (Lee, 1967)
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (DC.) Kitag.	Korean Peninsula	2n = 54	2n = 45, 54 (Lee, 1975)
<i>C. tenuisectum</i> Kitag.	Korean Peninsula	2n = 54	2n = 54 (Kim et al., 2001)
<i>C. mongolicum</i> Y. Ling	Sakhalin Botanical Garden, Far-East Branch of the Russian Academy of Sciences (cultivated)	2n = 54	2n = 54 (Zhukova, Petrovskiy, 1977; Yurtsev, Zhukova, 1982) Described as <i>D. mongolicum</i> (Ling) Tzvel. 1961, Flora of the USSR, vol. 26:378
<i>C. indicum</i> L.	Japan, Hiroshima University	–	2n = 36, 54 (Kamiaka, Yonezawa, 1989) 2n = 36 (Lee, Oh, 1976)
<i>C. boreale</i> Makino	Harbin, China	2n = 18	2n = 18 (Tanaka et al., 1989)
<i>C. pacificum</i> Nakai	Japan, Hiroshima University	–	2n = 90 (Kaneko, 1961; Watanabe et al., 1972; Shimotomai et al., 1968) Описана как <i>D. pacificum</i> (Nakai) Kitam.

–, no data.

осуществляли свежесобранной пылью однократно в период раскрытия большинства трубчатых цветков. Использовали простые межвидовые (прямые и обратные) и многокомпонентные скрещивания. Контроль – изоляция соцветий без опыления. В связи с разницей в сроках цветения маньчжурских и субтропических видов (*C. indicum*, *C. pacificum*) в гибридизацию привлекали ранее создан-

ные нами сортовидовые гибриды № 04-1 ('Вродлива' × *C. tenuisectum*) и № 05-25 ['Вродлива' × ('Вродлива' × *C. maximoviczii*)], цветущие одновременно с субтропическими видами. Побег с опыленными соцветиями срезали и дозаривали в условиях теплицы. Ревизию и обмолот семян проводили через один-два месяца после гибридизации, посев семян заканчивали в конце февраля – начале

марта в условиях обогреваемой теплицы. В открытый грунт сеянцы высаживали с апреля по май. Генетическую совместимость определяли по результатам завязывания семян, всхожести и жизнеспособности сеянцев. Оценку гибридного потомства проводили в первый год роста и после зимы. Устойчивость к грибным фитопатогенам (*Botrytis cinerea* Pers., *Puccinia horiana* Henn.) определяли на естественном инфекционном фоне в период эпифитотий *P. horiana* (2005–2006 гг.). Зимостойкость оценивали по весеннему отрастанию побегов по 5-балльной 6-ступенчатой шкале, где балл 0 соответствует полному вымерзанию растений, балл 5 – подмерзание отсутствует. Ритмы роста и развития изучали согласно (Методика..., 1975). Отбирали зимостойкие (4–5 баллов), без малейших признаков поражения грибными патогенами растения с адекватными сроками цветения. С 2005 по 2012 г. было выполнено 74 комбинации скрещиваний, опылено 731 соцветие, получено 9462 гибридных семени, выращено 1775 сеянцев, выделено 30 отборов.

Результаты и обсуждение

Предварительный анализ привлекаемых в гибридизацию видов показал, что все партнеры имеют фертильную пыльцу и хорошо завязывают семена при свободном опылении (Недолужко и др., 2002).

Совместимость видов и межвидовых гибридов при гибридизации

Эффективность межвидовых скрещиваний зависела от особенностей участвующих в гибридизации генотипов. Наиболее продуктивными и стабильными опылителями и материнскими производителями были тетраплоидные ($2n = 36$) и гексаплоидные ($2n = 54$) виды. Скрещивания видов с одинаковым числом хромосом (гексаплоид $\times$ гексаплоид) в прямом и обратном направлении проходили без всяких затруднений (табл. 2). Всхожесть семян и жизнеспособность гибридных сеянцев также были на высоком уровне: только незначительное число всходов погибло в ювенильном возрасте, остальное потомство развивалось нормально. Большинство реципрокных комбинаций тетраплоид ($2n = 36$) $\times$ гексаплоид ($2n = 54$) дали положительные результаты по завязыванию семян. Хорошая совместимость отмечена у тетраплоидных видов *C. naktongense* ($2n = 36$) и *C. leiophyllum* ($2n = 36$), использованных в качестве материнских форм в большинстве комбинаций с гексаплоидами ($2n = 54$). Завязываемость семян варьировала в зависимости от участников и направления скрещивания. Полученные семена дали жизнеспособное потомство, отдельные гибридные сеянцы имели частично стерильную пыльцу, но хорошо завязывали семена при свободном опылении. Скрещивания диплоидных ($2n = 18$) видов *C. chanetii* (см. рисунок, а) и *C. boreale* (в) удалось осуществить только в 2010 г. Получено потомство *C. boreale* $\times$ *C. chanetii* (д) и *C. chanetii* $\times$ *C. boreale*. Диплоиды в отдельных случаях частично совместимы с гексаплоидами *C. tenuisectum*, *C. coreanum* (г), *C. maximoviczii* и тетраплоидами *C. naktongense* (б), *C. leiophyllum*. Семена завязывались в незначительном количестве, слабо выполнены, всхожесть низкая, сеянцы деформированы или бесхлорофильны, погибали в те-

чение первых одного-двух месяцев. Только отдельные экземпляры сохранились и достигли генеративной фазы. Из этой серии получено жизнеспособное потомство гибридных комбинаций: *C. boreale* $\times$ *C. naktongense* (е), *C. chanetii* $\times$ *C. maximoviczii*, *C. coreanum* $\times$ *C. chanetii* (ж), *C. chanetii* $\times$ *C. leiophyllum*.

Большой разрыв в сроках цветения *C. zawadskii* Herbach и *C. mongolicum* Y. Ling с видами рода *Chrysanthemum* других хронологических групп, быстрая потеря жизнеспособности пыльцы при хранении не позволили нам провести скрещивания в полном объеме. Однако опыленные единичные соцветия завязали минимальное число семян, из которых выращены гибридные сеянцы.

Созданы сложные межвидовые гибриды *Chrysanthemum*, сочетающие в своем составе генетический материал трех видов. В комбинациях скрещиваний с участием четырех видов завязалось лишь незначительное число семян, давших малочисленное потомство (табл. 3). Получены также гибридные растения с участием субтропических видов *C. indicum*, *C. pacificum* и производных маньчжурских видов – сортовидовых гибридов № 04-1 (♀ ‘Вродлива’ $\times$ ♂ *C. tenuisectum*) и № 05-25 [♀ ‘Вродлива’ $\times$ ♂ (‘Вродлива’ $\times$ *C. maximoviczii*)].

Изменчивость межвидовых гибридов и межгибридных форм

Полученные межвидовые гибриды F_1 отличались хорошим развитием. Каждая межвидовая комбинация имела свои особенности, в пределах семьи сеянцы мономорфны, одномерны, сильно облиственны, с интенсивным побегообразованием, высокофертильны при свободном опылении. В отдельных F_1 семьях отмечены трансгрессивные растения, которые несут признаки, выходящие за пределы изменчивости родительских видов: наличие элементов махровости соцветий – *C. coreanum* ($2n = 54$) $\times$ *C. leiophyllum* ($2n = 36$), ранний срок цветения – *C. naktongense* ($2n = 36$) $\times$ *C. coreanum* ($2n = 54$), компактный карликовый габитус – *C. maximoviczii* ($2n = 54$) $\times$ *C. naktongense* ($2n = 36$), *C. naktongense* ($2n = 36$) $\times$ *C. maximoviczii* ($2n = 54$). В сложных межгибридных комбинациях большинство сеянцев характеризовалось нестабильным, аномальным ростом, интенсивным вегетативным размножением в ущерб генеративному развитию, лишь отдельные растения развивались гармонично.

Фитопатологическая оценка межвидовых F_1 гибридных семей выявила оптимальные гибридные комбинации и отдельные растения с высокой специфической устойчивостью к патогенам. Наибольшее число растений с комплексной устойчивостью к *Puccinia horiana* и *Botrytis cinerea* наблюдалось в семьях *C. coreanum* ($2n = 54$) $\times$ *C. tenuisectum* ($2n = 54$), *C. leiophyllum* ($2n = 36$) $\times$ *C. naktongense* ($2n = 36$), *C. leiophyllum* ($2n = 36$) $\times$ *C. coreanum* ($2n = 54$), *C. coreanum* ($2n = 54$) $\times$ *C. naktongense* ($2n = 36$), *C. coreanum* ($2n = 54$) $\times$ *C. leiophyllum* ($2n = 36$). Многокомпонентные межвидовые гибриды на основе маньчжурских видов демонстрировали полную невосприимчивость к *P. horiana* и большая их часть (91,5 %) – устойчивость к *B. cinerea*. Гибридная семья № 07-46, полученная с привлечением субтропического вида *C. indicum*, содержала только высокоустойчивые к *P. horiana* сеянцы. Расщепля-

Table 2. Results of the interspecific crossing of *Chrysanthemum*; BGI FEB RAS, 2005–2012

Parents	Number of pollinated inflorescences	Seed set		Seeds sown	Germinative capacity		Seedling survival, %	
		total	Per inflor.		seed- lings	%	by the end of the season	post- winter
<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	4	206	51.5	101	48	47.5	62.5	93.3
<i>C. maximoviczii</i> (2n = 54) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	5	275	55.0	200	47	23.5	63.8	96.7
<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	4	273	68.3	101	43	42.6	88.3	97.4
<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	6	474	79.0	414	131	31.6	63.4	93.9
<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. coreanum</i> (2n = 54)	9	468	52.0	286	195	68.2	63.6	96.2
<i>C. coreanum</i> (2n = 54) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	3	163	54.3	160	105	65.6	57.1	100
<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	7	359	51.3	200	35	16.7	91.4	96.9
<i>C. leiophyllum</i> (2n = 36) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	6	434	72.3	200	22	11.0	100	59.1
<i>C. maximoviczii</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	10	1158	115.8	400	191	47.8	64.9	71.8
<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	8	468	58.5	400	220	55.0	83.6	77.0
<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. coreanum</i> (2n = 54)	12	540	45.0	262	176	67.2	75.6	96.2
<i>C. coreanum</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	7	312	129.9	200	129	64.5	100	81.4
<i>C. maximoviczii</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	6	210	36.0	210	60	28.6	100	86.7
<i>C. leiophyllum</i> (2n = 36) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	3	67	22.3	59	15	25.4	100	80.0
<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	28	446	15.9	442	150	33.9	97.3	85.6
<i>C. leiophyllum</i> (2n = 36) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	15	18	1.2	18	14	77.8	100	64.3
<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54)	7	18	2.6	18	16	88.9	100	93.8
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	6	60	10.0	60	37	61.7	100	75.7
<i>C. coreanum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	12	274	22.8	274	75	27.4	98.7	95.9
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	4	500	125.0	200	36	18.0	83.3	83.3
<i>C. leiophyllum</i> (2n = 36) × <i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54)	7	270	38.6	200	11	5.5	100	100
<i>C. coreanum</i> (2n = 54) × <i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54)	4	89	22.3	89	36	40.4	100	52.8
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54) × <i>C. coreanum</i> (2n = 54)	4	259	64.8	200	186	93.0	100	87.6
<i>C. coreanum</i> (2n = 54) × <i>C. chanetii</i> (2n = 18)	4	22	5.5	22	10	45.5	30.0	100
<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. coreanum</i> (2n = 54)	7	19	2.7	19	3	15.8	100	0
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54) × <i>C. chanetii</i> (2n = 18)	12	9	1.5	9	4	44.4	100	100
<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	17	153	9.0	153	18	11.8	94.4	64.7
<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	16	79	4.9	79	27	34.2	96.3	53.8
<i>C. zawadskii</i> (2n = 54) × <i>C. mongolicum</i> (2n = 54)	2	8	4.0	8	1	12.5	100	100
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>latilobum</i> (2n = 54) × <i>C. zawadskii</i> (2n = 54)	3	75	25.0	50	5	10.0	100	100
<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>latilobum</i> (2n = 54) × <i>C. mongolicum</i> (2n = 54)	2	25	12.5	25	4	16.0	100	100
<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. chanetii</i> (2n = 18)	11	36	3.3	36	21	58.3	76.2	81.2
<i>C. mongolicum</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	2	8	4.0	4	1	25.0	100	100
<i>C. boreale</i> (2n = 18) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	31	103	3.3	103	7	6.8	42.9	33.3
<i>C. boreale</i> (2n = 18) × <i>C. chanetii</i> (2n = 18)	22	640	29.1	640	152	23.7	51.3	30.8
<i>C. boreale</i> (2n = 18) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	21	7	0.33	7	0	–	–	–
<i>C. boreale</i> (2n = 18) × <i>C. coreanum</i> (2n = 54)	35	20	0.57	20	0	–	–	–
<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. boreale</i> (2n = 18)	60	22	0.37	22	7	31.8	85.7	66.7



Chrysanthemum species and their F_1 progeny:

a – *C. chanetii*, collection of the Botanical Garden–Institute, Far East Branch of the RAS, 2008; b – *C. nakdongense*, in the nature (coast of Telyakovskiy Bay), 2004; c – *C. boreale*, same collection, 2009; d – *C. coreanum*, Lasovskiy reserve, 2004; e – *C. boreale* × *C. chanetii*, 2014; f – *C. boreale* × *C. nakdongense*, 2014; g – *C. coreanum* × *C. chanetii*, 2007.

ющееся потомство по признаку устойчивости к *P. horiana* (см. табл. 3) получено при скрещивании восприимчивого вида *C. pacificum* с устойчивым сортовым гибридом № 04-1 (♀ ‘Вродлива’ × ♂ *C. tenuisectum*).

Зимостойкость межвидовых F_1 гибридов варьировала в зависимости от компонентного состава. Максимальный выход зимостойких сеянцев получен в комбинациях с использованием высокостойких родителей. Выс-

шую зимостойкость проявили межвидовые гибриды на основе *C. tenuisectum* ($2n = 54$), *C. nakdongense* ($2n = 36$), *C. coreanum* ($2n = 54$). В ряде комбинаций установлено преимущественное влияние материнского родителя на зимостойкость потомства.

При скрещивании видов разного географического происхождения варьирование сроков цветения отдельных растений в пределах гибридной семьи незначительно

Table 3. Results of the crossing of interspecific hybrids of *Chrysanthemum*; BGI FEB RAS, 2007–2012

Family No.	Parents		Number of pollinated inflorescences	Seed set		Germinative capacity, %	Seedling survival, %	
	♀	♂		total	per inflor.		by the end of the season	post-winter
08-37	<i>C. leiophyllum</i> (2n = 36) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	6	16	2.7	6 (37.0)	6 (100)	3 (50.0)
08-43	<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	3	13	4.3	2 (15.4)	2 (100)	0
08-32	<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	<i>C. zawadskii</i> subsp. <i>acutilobum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	7	192	27.4	45 (23.4)	30 (66.7)	20 (66.7)
08-31	<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	<i>C. maximoviczii</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	10	398	39.8	141 (35.4)	89 (63.1)	82 (92.1)
08-36	<i>C. leiophyllum</i> (2n = 36) × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54)	<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	6	3	0.5	2 (66.7)	2 (100)	2 (100)
08-34	<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	5	9	1.8	5 (55.5)	4 (80.0)	2 (50.0)
08-33	<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	<i>C. maximoviczii</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	6	22	3.7	9 (40.9)	8 (88.9)	3 (37.5)
08-40	<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	<i>C. maximoviczii</i> (2n = 54) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	5	133	26.6	91 (68.4)	79 (86.8)	66 (83.5)
08-39	<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	<i>C. tenuisectum</i> (2n = 54) × <i>C. leiophyllum</i> (2n = 36)	3	38	12.7	28 (73.7)	15 (53.6)	15 (100)
35-11/04-10	<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. boreale</i> (2n = 18)	<i>C. boreale</i> (2n = 18) × <i>C. naktongense</i> (2n = 36)	132	12	0.09	12 (100)	0	–
16-13	<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. boreale</i> (2n = 18)	<i>C. naktongense</i> (2n = 36) × <i>C. chanetii</i> (2n = 18)	16	2	0.1	1 (50.0)	1 (100)	–
04-5	<i>C. pacificum</i> (2n = 90)	'Vrodliva' (2n = 54) × <i>C. tenuisectum</i> (2n = 54)	24	527	21.9	146 (27.7)	137 (93.8)	33 (24.1)
44-11	<i>C. chanetii</i> (2n = 18) × <i>C. boreale</i> (2n = 18)	<i>C. boreale</i> (2n = 18)	50	1	0.02	0	–	–
07-46	'Vrodliva' (2n = 54) × ('Vrodliva' × <i>C. maximoviczii</i> (2n = 54))	<i>C. indicum</i> (2n = 54)	10	146	14.6	72 (49.3)	50 (69.4)	10 (20.0)

(1–2 дня). Начало цветения сеянцев сдвигается в сторону родителя с более ранними датами. Гибридное потомство маньчжурских и субтропических видов отличалось более ранним цветением, чем их субтропические родители (*C. pacificum*, *C. indicum*), что позволило отобрать адекватные по срокам цветения генотипы.

В результате исследований отобрано 30 высокодекоративных межвидовых и межгибридных форм с комплексом адаптивных признаков (устойчивость к грибным фитопатогенам, зимостойкость, адекватность сроков цветения). Выделенные формы превосходят родителей по обилию цветения и интенсивности вегетативного возобновления и рекомендованы для озеленения и привлечения в селекцию в качестве комплексных источников адаптивности.

Заключение

Большинство многолетних восточноазиатских видов и подвидовых форм *Chrysanthemum* совместимы при гибридизации и дают фертильное потомство в равно-

и разноплоидных комбинациях. Комбинация скрещивания гексаплоид × гексаплоид открывает новые возможности селекции на уровне плоидности, так как перспективна в гибридизации с сортами хризантемы садовой, которые являются преимущественно гексаплоидами (2n = 54). Учитывая распространение большинства отечественных видов на пределе основного ареала рода *Chrysanthemum*, редкость и малочисленность популяций, испытывающих отрицательное антропогенное влияние, естественную приуроченность отдельных представителей рода к специфическим местообитаниям, не всегда способствующую успешному культивированию, представляется более надежным создание гибридов и сохранение в гибридных организмах ценных генов, чем введение в культуру чистых видов. Полученные впервые в России и имеющие обогащенную наследственность межвидовые гибриды *Chrysanthemum* – перспективный материал для непосредственного использования в озеленении и новый генофонд для создания отечественных сортов хризантемы садовой.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 09-04-98526-r_vostok_a, 2009–2010. The author is grateful to Prof. K. Kondo (Hiroshima University), Dr. A.A. Taran (Sakhalin Botanical Garden), and Drs. R.V. Dudkin and SunYang for kindly providing seed and stocking material of *Chrysanthemum* species. The author also acknowledges valuable remarks done by the reviewer.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

References

- Barkalov V.Iu. Rod *Chrysanthemum* L. Flora Rossiyskogo Dalnego Vostoka: Dopolnenie i izmenenie k izdaniyu «Sosudistye rasteniya Dalnego Vostoka» T. 1-8 (1985-1996) [Genus *Chrysanthemum* L. Flora of the Russian Far East. Amendment to "Vascular plants of the Far East", vols. 1-8 (1985-1996)]. Vladivostok, Dalnauka, 2006; 240-241. (in Russian)
- Bremer K., Humphries C. Generic monograph of the Asteraceae–Anthemideae. Bull. Nat. Hist. Mus. 1993; Bot. Ser. 23:73-177.
- Chen J. Studies on the origin of Chinese florist's chrysanthemum. Acta Hort. 1985;167:349-361.
- Chen J.Y., Wang S., Wang X., Wang P. Thirty years' studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars. Acta Hort. 1995;404:30-36.
- Dai S.L., Chen J.Y. Artificial interspecific cross among seven species of *Dendranthema* in China. J. Beijing Forestry Univ. 1996;18(4):16-18.
- Douzono M., Ikeda H. All year round productivity of F₁ and BC₁ progenies between *Dendranthema grandiflorum* and *D. shiwogiku*. Acta Hort. 1998;452:303-310.
- Dowrick G.J. The chromosomes of *Chrysanthemum*. I: The species. Heredity. 1952;6:365-375.
- Fukai S., Kamigaichi Y., Nozaki K. Cross compatibility between tetra ploid and octa ploid of *Dendranthema yoshinaganthum* Kitam. and characteristics of the progenies. Hort. Res. Japan. 2004;3(4):345-348. DOI 10.2503/hrj.3.345.
- Jong De J., Rademaker W. Interspecific hybrids between two *Chrysanthemum* species. Hort. Science. 1989;24(2):370-372.
- Kamelin R.V. Slozhnotsvetnye (kratkiy obzor sistemy) [Asteraceae (systematics overview)]. Saint-Petersburg; Barnaul, ASU Publ., 2000. (in Russian)
- Kamiaka H., Yonezawa Y. Hexaploid *Chrysanthemum indicum* L. (Compositae) newly found in the Shikoku district, western Japan. CIS Chromosome Inform. Serv. 1989;46:14-17.
- Kaneko K. Cytogenetical studies on three high polyploidy species of *Chrysanthemum*. J. Sci. Hiroshima Univ. 1961; Ser. B(2,9):59-98.
- Kharkevich S.S., Kachura N.N. Redkie vidy rasteniy Sovetskogo Dalnego Vostoka i ikh okhrana [Rare plant species in the Soviet Far East and their protection]. Moscow, Nauka, 1981. (in Russian)
- Kim J.S., Pak J.-H., Tobe H., Noguchi J. Differentiation of the *Chrysanthemum zawadskii* complex (Anthemideae, Asteraceae) in Korea. J. Plant Res. 2001;114(Suppl.):34.
- Krasnaya kniga Primorskogo kraya: Rasteniya [Red Book of Primorsky Krai: Plants]. Vladivostok, Apelsin Publ., 2008. (in Russian)
- Lee Y.N. Chromosome numbers of flowering plants in Korea. J. Korean Res. Inst. Ewha Women's Univ. 1967;11:455-478.
- Lee Y.N. Taxonomic study on white flowered wild *Chrysanthemum* in Asia. J. Korean Res. Inst. Better Living. 1975;14:63-79.
- Lee Y.N., Oh Y.C. Taxonomic study on yellow flowered wild *Chrysanthemum* in Korea. J. Korean Res. Inst. Better Living. 1976;17:143-154.
- Li X.L., Chen F.D., Zhao H.B. Compatibility of interspecific cross in *Dendranthema* genus. Acta Hort. Sinica. 2008;35(2):257-262.
- Metodika fenologicheskikh nablyudeniy v botanicheskikh sadakh SSSR [The technique of phenological observations in Botanical gardens of the USSR]. Moscow, Tsitsin Botanical Garden of the RAS Publ., 1975. (in Russian)
- Nedoluzhko A.I., Dudkin R.V., Fadeev K.E. Tsvetenie i opylenie prirodnikh vidov dendranthem v kulture [Flowering and pollination of *Dendranthema* species in cultivation]. Rol botanicheskikh sadov v sokhraneni bioraznootbraziya. Materialy mezhdunarodnoy konferentsii [Proceedings of the International Conference "Role of botanical gardens in biodiversity preservation"]. Rostov-on-Don, 2002:217-218. (in Russian)
- Oberprieler C., Vogt R., Watson L.E. Tribe Anthemideae Cass. Flowering plants. Eudicots. Asterales. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007;8:342-374.
- Pavlova T.A. Sibirskie khrizantemy [Siberian Chrysanthemums]. Novosibirsk, Geo Publ., 2011. (in Russian)
- Probatova N.S., Sokolovskaya A.P. Chromosome numbers in vascular plants from Primorye Territory, Amur River basin, north Koryakia, Kamchatka and Sakhalin. Bot. Zhurnal. 1988;73:290-293.
- Probatova N.S., Sokolovskaya A.P. Chromosome numbers in some representatives of the Asclepiadaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Chenopodiaceae, Lamiaceae, Oleaceae, Onagraceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, and Urticaceae families from the Far East of the USSR. Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 1990;75(11):1620-1623. (in Russian)
- Shimotomai N., Adachi S., Masumori S. Cytological, morphological and geographical studies on *Chrysanthemum shiwogiku* var. *kinokuniense*. Bot. Mag. (Tokyo). 1968;81:498-505.
- Shimotomai N., Takemoto T. Hybrids between *Chrysanthemum wakaense* and some species of *Chrysanthemum*, and the increase in chromosome number of the hybrids. Bot. Zool. 1940;8(4):61-66.
- Sokolovskaya A.P., Probatova N.S., Rudyka E.G. Chromosome numbers in species of the Asteraceae, Poaceae, and Rosaceae families from Primorsky Krai, Kamchatka, and Sakhalin. Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 1985;70(1):126-128. (in Russian)
- Soreng R.J., Cope E.A. On the taxonomy of cultivated species of the *Chrysanthemum* genus-complex (Anthemideae; Compositae). Baileya. 1991;23(3):145-165.
- Sun C.Q., Chen F.D., Teng N.J., Liu Z.L., Fang W.M., Hou X.L. Interspecific hybrids between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and *C. indicum* (L.) Des Moul. and their drought tolerance evaluation. Euphytica. 2010;174:51-60. DOI 10.1007/s10681-009-0005-6.
- Tanaka R., Kawasaki S., Yonezawa Y., Taniguchi H. Cytogenetic studies on wild *Chrysanthemum* from China V. F₁-hybrids of *Chrysanthemum lavandulaefolium* var. *sianense* × *C. boreale*. Cytologia. 1989;54:365-372.
- Tanaka R., Watanabe K. Embriological studies in *Chrysanthemum makinoi* and its hybrid crossed with hexaploid *C. japonense*. J. Faculty of Sci. Hiroshima Univ. 1972; Ser. B. Div. 2 (Botany). 14(2):75-84.
- Wang J.W., Yang J., Li M.X. Karyotypical study of five species of Chinese *Dendranthema*. Acta Botanica Yunnanica. 1991;13(4):411-416.
- Wang P., Chen J. Studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars. Acta Hort. 1990;17(3):223-228.
- Watanabe K. The control of diploid-like meiosis in polyploid taxa of *Chrysanthemum* (Compositae). Jpn. J. Genet. 1977;52(2):125-131. DOI 10.1266/jjg.52.125.
- Watanabe K., Nishii Y., Tanaka R. Anatomical observations on the high frequency callus formation from anther culture of *Chrysanthemum*. Jap. J. Genet. 1972;47:249-255.
- Yurtsev B.A., Zhukova P.G. Chromosome numbers in some plants from Northeastern Yakutia (middle reaches of the Indigirka River). Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 1982;67(6):778-787. (in Russian)
- Zhmyleva A.P., Kondo K. Comparison of somatic chromosomes in some species of *Chrysanthemum sensu lato* in Russia. Chromosome Botany. 2006;1:13-22.
- Zhukova P.G., Petrovskii V.V. Chromosome numbers in some plant species from Western Chukotka. Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 1977;62(8):1215-1223. (in Russian)

Влияние микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические показатели яровой пшеницы

А.М. Субботин¹, М.В. Нарушко¹ , Н.А. Боме², С.А. Петров¹, В.А. Мальчевский^{1, 2}, М.А. Габдуллин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Тюмень, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия

Для повышения урожайности зерновых культур в условиях северных регионов ведется поиск биологически активных препаратов на основе высокоэффективных штаммов бактерий из рода *Bacillus*. На сегодняшний день существует ряд подобных биопрепаратов (Фитоспорин-М, Бактофит, Гамаир, Интеграл и др.), однако их эффективность в северных регионах может быть снижена, так как активность интродуцированных микроорганизмов связана с их приживаемостью в ризосфере и ризоплане. Описано влияние бактерий рода *Bacillus* из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические показатели проростков мягкой яровой пшеницы сорта Иргина (энергию прорастания, лабораторную всхожесть семян, длину и сырую массу корней и побегов проростков), а также на длину coleoptilia и количество хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в вытяжке пигментов растительного материала. Показано, что всхожесть и морфометрические показатели под влиянием штаммов рода *Bacillus* из многолетнемерзлых пород были значительно выше по сравнению с действующим штаммом биопрепарата «Фитоспорин-М». Очевидно, что бактерии рода *Bacillus* в процессе набухания семян (во время их предпосевной обработки) вместе с водой попадают в зерновку и достаточно активно начинают расщеплять запасные питательные вещества, делая их более доступными для усвоения проростком. Высказано предположение, что повышение морфофизиологических показателей яровой пшеницы сорта Иргина является также следствием стимуляции системы фотосинтеза и, соответственно, увеличения эффективности поглощения световой энергии. Учитывая особенность влияния различных штаммов бактерий, выделенных из многолетнемерзлых пород, на морфофизиологические и биохимические параметры растений, можно разработать на их основе биопрепараты направленного или комплексного действия, используя для этого комбинации штаммов.

Ключевые слова: бактерии; многолетнемерзлые породы; мягкая яровая пшеница сорта Иргина; морфометрия; спектрофотометрия; стимуляция фотосинтеза; скорость роста; биопрепараты.

Influence of permafrost microorganisms on morphophysiological indicators of spring wheat

A.M. Subbotin¹, M.V. Narushko¹ , N.A. Bome², S.A. Petrov¹, V.A. Malchevskiy^{1, 2}, M.A. Gabdullin¹

¹ Tyumen Scientific Center, SB RAS, Tyumen, Russia

² Tyumen State University, Tyumen, Russia

Biologically active compounds on the basis of highly efficient strains of bacteria of the genus *Bacillus* are currently being sought for to increase the yield of grain crops in the North. There is a number of biological products available, including those based on bacteria in the genus *Bacillus* (Phytopsporin-M, Bactofit, Gamair, Integral, and other). However, the effectiveness of these drugs in the northern regions may be reduced, because the activity of introduced microorganisms depends on their adaptability in the rhizosphere and rhizoplane. This article describes the effect of bacteria of the genus *Bacillus* in permafrost on the morphological and physiological indicators of seedlings of soft spring wheat variety Irgina. These indicators are germination energy, laboratory seed germination, length and wet weight of roots and shoots of seedlings, as well as the length of coleoptile and number of chlorophylls *a*, *b* and carotenoid in the pigment extract from the plant material. It has been demonstrated that germination and morphometric parameters were significantly higher following exposure to *Bacillus* strains in permafrost than following treatment with the current strain of Phytopsporin-M. It is likely that in the process of swelling of seeds (during their preplant treatment) *Bacillus* bacteria reach the caryopsis with water and begin to cleave spare nutrients actively, making them easier accessible for assimilation by seedlings. It is proposed that the increase in morphophysiological indicators of spring wheat variety Irgina is also a consequence of stimulation of the photosynthesis system and, consequently, an increased efficiency of absorption of light energy. Considering how differently different strains of bacteria isolated from permafrost influence

the morphological and physiological and biochemical parameters of the plant, it appears that these strains or their combinations can be used for the development of biologics ensuring a comprehensive effect.

Key words: bacteria; permafrost; soft spring wheat variety Irgina; morphometry; spectrophotometry; stimulation of photosynthesis; growth rate; biologics.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Субботин А.М., Нарушко М.В., Боме Н.А., Петров С.А., Мальчевский В.А., Габдуллин М.А. Влияние микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические показатели яровой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):666-672. DOI 10.18699/VJ16.119

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Subbotin A.M., Narushko M.V., Bome N.A., Petrov S.A., Malchevskiy V.A., Gabdullin M.A. Influence of permafrost microorganisms on morphophysiological indicators of spring wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):666-672. DOI 10.18699/VJ16.119

Один из основных способов повышения урожайности зерновых культур – использование минеральных удобрений и химических средств защиты растений. Однако чрезмерное их применение увеличивает опасность загрязнения окружающей среды. В связи с этим актуален поиск путей увеличения продуктивности и адаптационного потенциала растений в зонах рискованного земледелия и меняющихся климатических условий. Работы в этом направлении ведутся с помощью методов селекции, геномики и генетики (Генетические основы..., 2008; Костин, Ерофеева, 2010; Крупнов, 2011; Юдина и др., 2014).

Обозначенная проблема может быть решена и посредством применения биологически активных препаратов – как химических (Богданова и др., 2012) так и биологических, например с использованием высокоэффективных штаммов бактерий (Ляличкин, 2011). В настоящее время существует ряд биопрепаратов, в том числе на основе бактерий из рода *Bacillus* (Фитоспорин-М, Бактофит, Гамаир, Интеграл и др.), и идет поиск новых перспективных штаммов. Однако эффективность применения подобных препаратов в условиях северных регионов может снижаться, так как активность интродуцированных микроорганизмов (МО) связана с их приживаемостью в ризосфере и ризоплане (Сидоренко, Войно, 1999).

Выходом из данной проблемы может стать создание фитостимуляторов на основе бактерий, выделенных из многолетнемерзлых пород (ММП). Микроорганизмы, сохранившие жизнеспособность в течение длительного времени в условиях низких температур и замедленного метаболизма и вынужденные адаптироваться к неблагоприятным факторам среды, могут обладать высокой приспособляемостью к почвенно-климатическим условиям Западной Сибири. В то же время биологическое влияние бактерий из ММП как на растения, так и на другие современные организмы практически не изучено. Этот вопрос рассматривается лишь в отдельных работах (Калёнова и др., 2011; Brushkov et al., 2011; Субботин и др., 2011, 2012), свидетельствующих об изменении адаптивного потенциала лабораторных животных и гидробионтов.

Цель исследования – оценить влияние некоторых штаммов рода *Bacillus*, выделенных из ММП, на морфофизиологические параметры мягкой яровой пшеницы сорта Иргина.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено в 2012 г. на семенах яровой мягкой пшеницы сорта Иргина (*Triticum aestivum* L.) тюменской репродукции 2011 г., районированного в Тюменской области. В работе использовали штаммы микроорганизмов рода *Bacillus*, выделенные из ММП и идентифицированные на основании анализа последовательностей 16S рРНК: B1M – *B. cereus*, B2T – *B. megaterium*, B1CH – *Citrobacter youngae*, B2CH – *Serratia fonticola*. Полученные последовательности сравнивали с базой данных GenBank с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997). Редактирование последовательностей проводили при помощи программы BioEdit (Saitou, Nei, 1987; Tamura et al., 2007).

В качестве контроля сравнения использовали штамм *Bacillus subtilis* 26Д, выделенный из коммерческого бактериального препарата «Фитоспорин-М». Препарат «Фитоспорин-М» обогащен ионами металлов, микроэлементами и гуматами (Менликиев и др., 1996).

Культивирование штаммов бактерий осуществлялось по описанной ниже методике. Штаммы бактерий высевали в пять пробирок на скошенный питательный агар (ГРМ-агар, ГУ 9398-020-78095326-2006, г. Оболensk) и культивировали в термостате 24 ч при температуре 26 °С. Затем производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл дистиллированной воды. Концентрацию микроорганизмов устанавливали культуральным методом серийных разведений по количеству КОЕ на агаризованной питательной среде в чашках Петри (Герхард, 1984). После определения количества клеток бактерий в исходной суспензии плотность культур доводили до рабочей концентрации 1×10^7 микробных клеток в 1 мл дистиллированной воды (м.к./мл).

Семена пшеницы ($n = 100$) помещали в 50 мл бактериальной суспензии на 2 ч. Для увеличения адгезии МО в раствор для обработки семян добавляли сахарозу из расчета 50 г на 1 л дистиллированной воды. Посевы проводились в песок, двукратно прокаленный при 250 °С в течение 1 ч. В отдельные вегетационные сосуды объемом 0,5 л высевали по 25 семян и однократно поливали 50 мл бактериальной суспензии, повторность опыта четырехкратная. Семена проращивали в лабораторных условиях при температуре $22 \pm 1,5$ °С. На 3-и сутки эксперимента определяли энергию прорастания, на 7-е сутки – лабо-

рационную всхожесть семян, на 20-е сутки производили измерения показателей длины и сырой массы корней и побегов проростков, а также длины coleoptily (Боме и др., 2007).

Количество хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом. Навеску растительного материала растирали с Na_2SO_4 и 96 % этиловым спиртом. Полученный гомогенат фильтровали и количественно переносили в мерную колбу. Для расчета концентраций хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в вытяжке пигментов определяли ее оптическую плотность на спектрофотометре ПЭ-5400УФ при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения определяемых пигментов в данном растворителе: $\lambda = 662, 644$ и 440 нм. Контроль – чистый растворитель (96 % спирт), $l_{\text{кув}} = 2$ см. Концентрацию пигментов в вытяжке рассчитывали по следующим формулам (Шульгин, Ничипорович, 1974): $C_a = 9,78D_{662} - 0,99D_{664}$, $C_b = 21,43D_{664} - 4,65D_{662}$, $C_k = 4,7D_{440} - (1,38D_{662} - 5,48D_{644})$, где D – оптическая плотность при данной длине волны, C – концентрация хлорофиллов *a* и *b* или каротиноидов.

Статистическая обработка полученных данных (среднее значение, дисперсия средних, параметрическое сравнение по *t*-критерию Стьюдента, частотный анализ) проводилась с помощью программы SPSS ver. 11.5 for Windows.

Результаты и обсуждение

Известно, что семенной материал должен полностью соответствовать ГОСТам в отношении не только сортовых, но и посевных качеств. Последние характеризуются такими важными показателями, как энергия прорастания и всхожесть. Семена с высокой энергией прорастания дают дружные и полноценные всходы, которые меньше угнетаются сорняками, более устойчивы к внешним неблагоприятным условиям. При плохой всхожести получают изреженные посевы, что в значительной мере влияет на величину урожая сельскохозяйственных культур (Асатурова и др., 2013).

Анализ семенного материала яровой пшеницы сорта Иргина при обработке штаммами микроорганизмов из ММП показал, что энергия прорастания и лабораторная всхожесть варьируют в зависимости от варианта опыта (табл. 1). Энергия прорастания в интактном контроле составила $29,00 \pm 4,54$ %, в варианте с препаратом «Фитоспорин-М» – $76,00 \pm 4,27$ %, со штаммом *B. subtilis* 26Д – $24,00 \pm 4,27$ %. При этом энергия прорастания в вариантах со штаммами В1М и В1СН была достоверно выше, чем в интактном контроле ($p < 0,05$), а также относительно контроля сравнения: В1СН ($p < 0,05$) и В1М ($p < 0,01$). Лабораторная всхожесть в интактном контроле составила $83,00 \pm 3,75$ %, в варианте с Фитоспорином-М – $97,00 \pm 1,70$ %, со штаммом *B. subtilis* 26Д – $52,00 \pm 5,09$ %.

В варианте со штаммом В1СН этот показатель был достоверно выше интактного контроля ($p < 0,05$) и имел максимальное значение среди всех опытных вариантов – $95,00 \pm 2,18$ %. Относительно контроля сравнения лабораторная всхожесть семян яровой пшеницы сорта Иргина во всех опытных вариантах была намного выше ($p < 0,01$). Отмечена значительная задержка прорастания

семян при обработке их штаммом *B. subtilis* 26Д, что нашло отражение в показателе всхожести ($p < 0,01$).

Поскольку в состав Фитоспорино-М, помимо бактерий штамма *B. subtilis* 26Д, входят дополнительные компоненты, можно предположить, что именно добавки в большей мере стимулируют ростовые процессы в семенах.

Таким образом, установлено, что штаммы В1СН и В1М оказали выраженный стимулирующий эффект на энергию прорастания семян растений. Штамм В1СН также существенно повышал всхожесть семян. Штамм *B. subtilis* 26Д не оказал явного влияния на посевные качества семенного материала.

При оценке влияния исследуемых штаммов бактерий на процесс роста и развития проростков были обнаружены следующие морфометрические изменения относительно интактного контроля: увеличение длины побега на величину до 19,2 %, длины корня – до 16,1 %, длины coleoptily – до 25,3 % (табл. 2).

При оценке развития надземной части проростков отмечено максимальное увеличение длины побега среди изучаемых штаммов в варианте со штаммом В1М: на 19,2 % относительно интактного контроля и на 34,2 % относительно контроля сравнения. В вариантах со штаммами В2СН и В1СН величина данного показателя достоверно снизилась ($p < 0,05$). Для варианта В2Т достоверных различий не выявлено. При этом установлено достоверное снижение массы побега под влиянием штаммов В2СН, В1СН и В2Т относительно интактного контроля ($p < 0,01$) и контроля сравнения ($p < 0,01$). Снижение значений данного показателя относительно контроля сравнения наблюдалось и в остальных опытных вариантах ($p < 0,05$).

Другим показателем интенсивности роста и развития проростков являются длина и масса корней. В варианте, обработанном штаммом В1М, наблюдалось увеличение, а в варианте со штаммом В2СН, напротив, уменьшение длины корней относительно интактного контроля ($p < 0,01$). Следует отметить, что во всех опытных вариантах, за исключением В2СН, длина корней значительно возросла по отношению к контролю сравнения ($p < 0,01$). Масса корней во всех опытных вариантах значительно меньше, чем в интактном контроле ($p < 0,01$), однако относительно контроля сравнения в двух опытных вариантах данный показатель был достоверно выше ($p < 0,05$). В вариантах со штаммами В1СН и В2СН достоверных различий по отношению к контролю сравнения не обнаружено.

Известно, что при прорастании семян сначала на поверхности почвы в виде шильца появляется стеблевой побег. Он покрыт прозрачным листом (coleoptилем), который предохраняет стебель и первый лист от механических повреждений во время его роста в почве. Как только лист достигает нормального размера, coleoptиль отмирает. Учитывая, что длина coleoptily является одним из важнейших признаков, от которого в значительной степени зависит полевая всхожесть семян, нами была произведена оценка влияния микроорганизмов из ММП на данный показатель. Установлено, что у проростков, обработанных штаммами В1СН, В2СН, длина coleoptily достоверно увеличивается относительно интактного контроля ($p < 0,01$) и контроля сравнения ($p < 0,01$). В варианте

Table 1. Germinative power and germination percentage of spring wheat cv. Irgina seeds

Treatment	Germinative power	Germination percentage
Intact control	29.00 ± 4.54	83.00 ± 3.75 ^{##}
Phytopsporin M	76.00 ± 4.27 ^{** ##}	97.00 ± 1.70 ^{* ##}
Reference (<i>B. subtilis</i> 26D)	24.00 ± 4.27	52.00 ± 5.09 [*]
B1M	61.00 ± 4.88 ^{* ##}	89.00 ± 3.13 ^{##}
B1CH	40.00 ± 4.90 ^{* #}	95.00 ± 2.18 ^{* ##}
B2T	33.00 ± 4.70	85.00 ± 3.57 ^{##}
B2CH	27.00 ± 4.44	85.00 ± 3.57 ^{##}

Here and in Tables 2 and 3: ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$, significance of differences from the intact control;
[#] $p < 0.05$; ^{##} $p < 0.01$, significance of differences from the reference.

Table 2. Effect of bacteria from permafrost rocks on morphometric indices of spring wheat seedlings

Treatment	Shoot		Root		Coleoptile length, cm
	Length, cm	Weight, g	Length, cm	Weight, g	
Intact control	24.11 ± 1.04	0.135 ± 0.006	10.22 ± 0.30 ^{##}	0.158 ± 0.009 ^{##}	3.05 ± 0.10 ^{##}
Phytopsporin M	32.16 ± 0.50 ^{** ##}	0.191 ± 0.008 ^{** #}	14.48 ± 0.20 ^{** ##}	0.065 ± 0.009 ^{**}	3.49 ± 0.11 ^{* ##}
Reference (<i>B. subtilis</i> 26D)	21.41 ± 2.46	0.152 ± 0.011	4.44 ± 0.20 ^{**}	0.078 ± 0.013 ^{**}	1.66 ± 0.11 ^{**}
B1M	28.74 ± 0.56 ^{** #}	0.123 ± 0.005 [#]	11.86 ± 0.16 ^{** ##}	0.103 ± 0.004 ^{** #}	3.09 ± 0.09 ^{##}
B1CH	22.20 ± 0.33 [*]	0.109 ± 0.004 ^{** ##}	9.90 ± 0.31 ^{##}	0.088 ± 0.004 ^{**}	3.82 ± 0.05 ^{** ##}
B2T	24.35 ± 0.53	0.123 ± 0.003 ^{** ##}	9.48 ± 0.28 ^{##}	0.119 ± 0.003 ^{** #}	2.70 ± 0.05 ^{* ##}
B2CH	20.82 ± 0.43 [*]	0.101 ± 0.003 ^{** ##}	4.83 ± 0.20 ^{**}	0.095 ± 0.023 ^{**}	3.80 ± 0.04 ^{** ##}

со штаммом B2T этот показатель снижается ($p < 0,05$), а в варианте со штаммом B1M достоверных отличий выявлено не было. В опыте с Фитоспорином-М отмечалось достоверное увеличение всех морфометрических показателей по сравнению с контрольными значениями, кроме массы корней. Данный показатель оказался ниже значения интактного контроля на 58,9 %. Достоверных различий по массе корней относительно контроля сравнения не выявлено.

Таким образом, нами установлено, что штамм B1M оказывает значимое положительное влияние на морфометрические показатели проростков яровой пшеницы. При обработке семян препаратом «Фитоспорин-М», содержащим штамм *B. subtilis* 26Д, наблюдалось повышение всех исследуемых показателей относительно контрольных случаев, за исключением массы корней – этот показатель был снижен по сравнению с интактным контролем ($p < 0,01$). Однако полученные данные позволяют констатировать, что сам по себе штамм *B. subtilis* 26Д не только не оказывает значимого стимулирующего влияния на рост и развитие проростков яровой пшеницы, но и по ряду морфометрических показателей вызывает задержку развития корневой системы и интенсивности прорастания семян.

Решающую роль в процессе фотосинтеза и в конечном итоге в продуктивности растений в целом играют

пигменты – хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды (Каташов, 2014). В ходе опыта установлено, что замачивание семян в бактериальной суспензии перед их посевом приводило к изменению содержания пигментов в проростках пшеницы. Из результатов, представленных в табл. 3, видно, что между опытными штаммами отмечаются достоверные различия по содержанию хлорофиллов *a* и *b*.

При обработке растений штаммом B2CH содержание хлорофилла *a* повышалось на 4,2 % по сравнению с интактным контролем и на 43,2 % относительно контроля сравнения. Под влиянием штамма B1CH наблюдалось снижение содержания пигмента по отношению к контролю. В варианте со штаммом B1M концентрация хлорофилла *a* снижалась на 5,7 % относительно интактного контроля, однако была выше на 30,7 % относительно контроля сравнения. Между вариантом B2T и интактным контролем достоверных различий по содержанию пигмента выявлено не было, но относительно контроля сравнения концентрация хлорофилла *a* повышалась на 36,6 %. При этом установлено, что препарат «Фитоспорин-М» не оказывает влияния на содержание хлорофиллов *a* и *b*, а при обработке штаммом *B. subtilis* 26Д их концентрация снижается относительно интактного контроля ($p < 0,01$).

Содержание хлорофилла *b* было увеличено относительно контролей во всех случаях использования штаммов МО из ММП ($p < 0,01$). Максимальное значение наблюдалось

Table 3. Photosynthesis pigments (mg/g wet weight) in wheat seedlings

Treatment	Chlorophylls		Total chlorophyll	Carotenoids	Ratios	
	<i>a</i>	<i>b</i>			<i>a/b</i>	(<i>a + b</i>)/ carotenoids
Intact control	0.944 ± 0.003 ^{##}	0.827 ± 0.018 ^{##}	1.771 ± 0.011 ^{##}	0.659 ± 0.005	1.142	2.686 ^{##}
Phytopsporin M	0.939 ± 0.003 ^{##}	0.862 ± 0.016 ^{##}	1.801 ± 0.009 ^{##}	0.662 ± 0.004	1.090	2.719 ^{##}
Reference (<i>B. subtilis</i> 26D)	0.687 ± 0.002 ^{**}	0.627 ± 0.004 ^{**}	1.308 ± 0.003 ^{**}	0.661 ± 0.002	1.087	1.98 ^{**}
B1M	0.891 ± 0.002 ^{** ##}	1.001 ± 0.005 ^{** ##}	1.899 ± 0.004 ^{** ##}	0.681 ± 0.001 ^{** #}	0.883 ^{* #}	2.79 ^{* ##}
B1CH	0.670 ± 0.001 ^{** #}	0.948 ± 0.002 ^{** ##}	1.618 ± 0.001 ^{** ##}	0.565 ± 0.001 ^{** ##}	0.707 ^{* #}	2.866 ^{* ##}
B2T	0.931 ± 0.001 ^{##}	1.118 ± 0.002 ^{** ##}	2.049 ± 0.001 ^{** ##}	0.728 ± 0.001 ^{** ##}	0.833 ^{* #}	2.815 ^{* ##}
B2CH	0.983 ± 0.001 ^{* ##}	1.816 ± 0.003 ^{** ##}	2.799 ± 0.002 ^{** ##}	0.935 ± 0.001 ^{** ##}	0.542 ^{** ##}	2.994 ^{* ##}

в варианте со штаммом B2CH – содержание хлорофилла *b* превысило уровень интактного контроля в 2,2 раза, а уровень контроля сравнения почти в 3 раза. Полученные данные могут свидетельствовать об активации системы фотосинтеза под влиянием штаммов МО из ММП, в то время как в варианте со штаммом *B. subtilis* 26Д этот показатель достоверно снижен ($p < 0,01$) относительно интактного контроля.

Как известно, в пигмент-белковые комплексы реакционных центров входит хлорофилл *a*, а в светособирающий комплекс – хлорофиллы *a* и *b*. При этом содержание хлорофилла *a* в светособирающем комплексе превышает содержание хлорофилла *b* (Lichtenthaler, 1987; Рубин и др., 1988). Постольку хлорофилл *b* практически полностью содержится в светособирающем комплексе, увеличение хлорофилла *a* приводит не только к изменению соотношения *a/b*, но и к относительному увеличению количества реакционных центров и уменьшению относительного числа светособирающих комплексов.

В ходе эксперимента установлено, что отношение хлорофиллов *a/b* в вариантах с использованием микроорганизмов из ММП достоверно снижалось относительно интактного контроля и контроля сравнения ($p < 0,05$) за счет значительного увеличения содержания хлорофилла *b*. Особенно это заметно в варианте с обработкой семян штаммом B2CH, где, как говорилось выше, содержание хлорофилла *b* превышает значения в интактном контроле в 2,2 раза, а в контроле сравнения в 2,9 раза. В случае применения Фитоспорина-М достоверных отличий от контролей не обнаружено. При этом общее содержание хлорофиллов возрастало во всех опытных вариантах, за исключением B1CH.

Другим компонентом пигментной системы являются каротиноиды. Они переносят электроны в возбужденном состоянии к фотохимическим реакционным центрам, поглощая свет в той области спектра, в которой не способен поглощать хлорофилл (Зотикова и др., 2001; MacFarlena, 2002), и защищают пигменты и ненасыщенные жирные кислоты липидов от окислительного повреждения, устраняя избыток активных форм кислорода (Lai, McKersie, 1993; Седых, Игнатьев, 2001). Увеличенное относительно хлорофиллов содержание каротиноидов может свиде-

тельствовать о повышении уровня стрессоустойчивости растений.

В данном исследовании установлено, что количественное содержание каротиноидов в проростках семян, обработанных штаммами МО ММП (за исключением штамма B1CH), увеличено относительно интактного контроля, контроля сравнения, а также случая с препаратом «Фитоспорин-М» ($p < 0,01$ в вариантах B2CH и B2T; $p < 0,01$ в варианте B1M). После обработки семян штаммом B1CH содержание каротиноидов в проростках снижается на 14,4 % относительно интактного контроля и на 14,7 % относительно контроля сравнения.

Еще один показатель, характеризующий процесс фотосинтеза, – это соотношение суммы хлорофиллов (*a + b*) и каротиноидов. Во всех опытных вариантах наблюдалось достоверное увеличение этого отношения относительно интактного контроля ($p < 0,05$), относительно контроля сравнения этот показатель был выше приблизительно в 1,5 раза.

Таким образом, в опытных вариантах B1M, B2T и B2CH отмечено повышение общего содержания хлорофиллов и каротиноидов и увеличение отношения суммы хлорофиллов к каротиноидам.

Полученные результаты свидетельствуют об общей активации фотосинтетической системы и защитных функций растений при предпосевной обработке семян пшеницы штаммами бактерий рода *Bacillus*, выделенными нами из ММП, что, очевидно, имеет существенное положительное значение на ранних этапах их развития.

Заключение

Обобщая результаты эксперимента, можно заключить, что различные штаммы *Bacillus* из ММП по-разному воздействуют на биологические свойства семян, рост и развитие проростков пшеницы. Наиболее существенное влияние на исследованные параметры растений оказывает штамм B1M. Он оказал положительное влияние на 9 из 13 анализируемых показателей, в том числе на энергию прорастания и всхожесть семян, фотосинтетическую систему растений и их защитные функции. Далее, в порядке убывания влияния на количество показателей морфофизиологических параметров растений, следуют штаммы

B2СН, В1СН и В2Т. Штамм В2СН положительно воздействует на рост coleoptily и содержание каротиноидов, что может способствовать увеличению защитных функций растительного организма. При этом штамм В2СН в основном оказывает положительное влияние на систему фотосинтеза, в наименьшей степени затрагивая защитные функции растений. Штамм В1СН в большей степени влияет на всхожесть и энергию прорастания семян, не оказывая выраженного влияния на фотосинтетический аппарат растений. Необходимо отметить, что, за исключением штамма В1СН, все остальные исследованные штаммы бактерий, выделенных из ММП, при обработке ими посевного материала приводят к активации системы фотосинтеза растений. Стимуляция этой системы, в свою очередь, ведет к большей эффективности поглощения световой энергии в лабораторных условиях и, как следствие, способствует повышению продуктивности растений.

Вероятно, различия между исследуемыми штаммами по воздействию на морфофизиологические параметры растений объясняются разными механизмами действия этих штаммов. Можно предположить, что бактерии, выделенные из многолетнемерзлых пород, в процессе набухания семян во время их предпосевной обработки вместе с водой попадают в зерновку и достаточно активно начинают расщеплять запасные питательные вещества, делая их более доступными для усвоения проростком. Очевидно, это может оказывать прямое влияние на энергию прорастания и всхожесть, что и наблюдается при использовании штаммов В1М и В1СН. Повышение биодоступности запасных питательных веществ в последующем развитии растения может обуславливать более высокую скорость роста побега и coleoptily.

Известно, что почвенные микроорганизмы способны синтезировать очень большое количество различных биологически активных веществ, в том числе цитокининов, гиббереллинов, микробных фитогормонов (Merriman et al., 1974; Green, 1980; Holland, 1997; Joo et al., 2004). Вполне ожидаемо, что бактерии-продуценты подобных веществ могут оказывать влияние как на морфофизиологические, так и на биохимические показатели растений, в том числе на активацию системы фотосинтеза и повышение защитных функций за счет увеличения выработки каротиноидов, азометина, диеновых конъюгатов. Не исключено, что отобранные нами штаммы бактерий оказывают влияние на концентрацию этих веществ у растений, что предполагается исследовать при продолжении данной работы. Учитывая особенности влияния выделенных из ММП штаммов бактерий на морфофизиологические и биохимические параметры растений, возможно разработать на их основе биопрепараты направленного или комплексного действия, используя для этого комбинации штаммов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402.

- Asaturova A.M., Nadykta V.D., Ismailov V.Ya., Dubyaga V.M., Tomashevich N.S., Zharnikova M.D., Zhevnova N.A., Homyak A.I. Study of the influence bacterization seed on growth and development of fall wheat. *Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal KubGAU = Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University.* 2013;85:43-56. (in Russian)
- Bogdanova E.D., Lewites E.V., Mahmudova K.H. Marker traits of variability induced in *Triticum aestivum* L. by nicotinic acid. *Genetika = Genetics (Moscow).* 2009;45(3):354-359. (in Russian)
- Bome N.A., Belozerova A.A., Bome A.Ya. *Biologicheskie svoystva semyan i fenogeneticheskii analiz kulturnykh rasteniy: uchebno-metodicheskoe posobie [Biological properties of seeds and phenogenetical analysis of crops: guidance manual].* Tyumen, 2007. (in Russian)
- Brouchkov A.V., Melnikov V.P., Sukhovei Yu.G., Griva G.I., Repin V.E., Kalenova L.F., Brenner E.V., Subbotin A.M., Trofimova Y.B., Tanaka M., Katayama T., Utsumi M. Relict microorganisms of cryolithozone as possible objects of gerontology. *Advances Gerontol.* 2011;1(1):39-44.
- Gerhardt F. *Metody obshchey bakteriologii. Tom. 3 [Methods of General Bacteriology. Vol. 3].* Moscow, Mir Publ., 1984. (in Russian)
- Green E. Cytokinin production by microorganisms. *Bot. Rev.* 1980;46(1):25-74.
- Holland M.A. Are cytokinins produced by plant? *Plant Physiol.* 1997;115:865-868.
- Joo G.J., Kim Y.M., Lee I.J., Song K.-S., Rhee I.-K. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilis*. *Biotechnol. Lett.* 2004;26(6):487-491.
- Kalenova L.F., Sukhovei Yu.G., Brushkov A.V., Melnikov V.P., Fisher T.A., Besedin I.M., Novikova M.A., Efimova J.A., Subbotin A.M. Experimental study of the effects of permafrost microorganisms on the morphofunctional activity of the immune system. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2011;151(2):164-167. (in Russian)
- Katashov D.A., Khryanin V.N. Influence of phytohormones and sodium selenate on pigment content and productivity of rape (*Brassica napus*) cv. Ratnik plants. *Izvestiya VUZov. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki = University proceedings. Volga region. Natural sciences.* 2014;1(5):25-34. (in Russian)
- Kil'chevskiy A.V., Khotyleva L.V. (Sci. eds.) *Geneticheskie osnovy selektsii rasteniy [Genetic Bases of Plant Breeding]. Tom 1: Obshchaya genetika rasteniy [Vol. 1: General Plant Genetics].* Minsk, Belorusskaya nauka Publ., 2008. (in Russian)
- Kostin V.I., Erofeeva E.N. Adaptation of a winter wheat population to abiotic environmental factors in the autumn, winter, and spring under the effect of natural growth regulators. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University.* 2010;6(68):9-13. (in Russian)
- Krupnov V.A. Drought and breeding of wheat: a systematic approach. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2011;1:12-23. (in Russian)
- Lai F.-M., McKersie B.D. Effect of nutrition of maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science.* 1993;91(1):87-95.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymolog.* 1987;148:350-382.
- Lyalichkin O.A. Influence of biological products and fertilizers on barley productivity and grain quality. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2011;8:29-31. (in Russian)
- MacFarlena G.R. Leaf biochemical parameters in *Avicennia marina* (Forsk) Vierh as potential biomarkers of heavy metal stress in estuarine ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 2002;3:244-256.
- Menlikiev M.Ya., Nedorezkov V.D., Vanyants G.M., Mineev M.I. Fitosporin [Phytopsporin]. Ufa, Immunopreparat Enterprise, 1996. (in Russian)
- Merriman P.R., Price R.D., Kollmorgen J.F., Piggot T., Ridge E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces*

- griseus* on the growth of cereals and carrots. Austral. J. Agr. Res. 1974;25(2):219-226.
- Rubin A.B., Venediktov P.S., Krendeleva T.E., Pashchenko V.Z. The regulation of initial stages of photosynthesis when changing the physiological state of plants. Fotosintez i produktsionnyy protsess: Sbornik statey mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii [Photosynthesis and production process. Coll. Articles Intern. Scientific Practical. Conference]. Moscow, 1988;29-39. (in Russian)
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evolution. 1987;4(4): 406-425.
- Sedykh V.N., Ignatiev L.A. The response of cultivated cedar and fir to oil drilling waste: remote consequences. Sibirskiy ekologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Ecology. 2001;3:355-360. (in Russian)
- Shulgin I.A., Nichiporovich A.A. Calculation of the content of pigments using nomograms. Chlorophyll. Sbornik statey mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii [Proceedings of the Intern. Scientific and Practical Conference]. Minsk, 1974;127-136. (in Russian)
- Sidorenko O.D., Voyno L.I. The use of microorganisms of the rhizosphere as a promising bacterial product for agriculture. Vestnik TGU = Tomsk State University Journal. 1999;4(1):87-91. (in Russian)
- Subbotin A.M., Gnatchenko L.N., Petukhova G.A. Research of physiological parameters of culture of infusorians *Paramecium caudatum* at influence of filtrates of bacterial cultures of sort *Acinetobacter*. Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University. 2011;12:149-150. (in Russian)
- Subbotin A.M., Kalenova L.F., Bazhin A.S. Influence of some strains of bacteria isolated from permafrost on the immune and physiological parameters of mice. Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science. 2012;4:164. (in Russian)
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evolution. 2007;24:1596-1599.
- Yudina R.S., Leonova I.N., Salina E.A., Khlestkina E.K. Effect of alien genomic introgressions on the osmotic tolerance of wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1):643-649. (in Russian)
- Zotikova A.P., Vorobyev N.A., Sobolevskaya Yu.S. Dynamics of the content and the role of carotenoids in needles of Siberian cedar in highlands. Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of Bashkir University. 2001;2:67-69. (in Russian)



Генетическое разнообразие трех вирусов яблони, выделенных в Беларуси

П.В. Кузмицкая , О.Ю. Урбанович

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

Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), вирус ямчатости древесины яблони (ASPV) и вирус борозчатости древесины яблони (ASGV) распространены во всех странах, где возделывается яблоня. В данной работе исследовалось генетическое разнообразие этих патогенов на территории Беларуси. Зараженные различными вирусными инфекциями деревья были обнаружены с помощью метода ОТ-ПЦР в современных садовых насаждениях. Среди старых деревьев, возрастом более 50 лет, зараженных не выявлено. Фрагменты геномов вирусов ACLSV, ASPV и ASGV были клонированы и секвенированы. Анализ их нуклеотидных последовательностей свидетельствует о высокой молекулярной вариабельности, сформированной за счет однонуклеотидных замен, реже – однонуклеотидных делеций и инсерций. Некоторый вклад в существующее генетическое разнообразие популяции вирусов также могли вносить и рекомбинационные процессы. Оценка селекционного давления на фрагменты геномов ACLSV, ASPV и ASGV, полученные в настоящем исследовании, а также гомологичные последовательности из базы данных GenBank свидетельствует о том, что они находятся под воздействием отрицательной селекции, за исключением одного кодона в последовательности белка оболочки ACLSV, находящегося под воздействием положительной селекции. При исследовании филогенетических взаимоотношений изолятов вирусов, выделенных в разных странах, четкой зависимости между географическим происхождением и степенью идентичности фрагментов геномов вирусов выявлено не было.

Ключевые слова: вирусы яблони; ОТ-ПЦР; ACLSV; ASGV; ASPV; генетическое разнообразие; селекционное давление.

Distribution and genetic diversity of three apple viruses in Belarus

P.V. Kuzmitskaya , O.Yu. Urbanovich

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

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem pitting virus (ASPV), and apple stem grooving virus (ASGV) are common in all apple cultivating countries including Belarus. The aim of this investigation was to study the genetic diversity of the apple-tree viruses in Belarus. Virus-infected apple trees were identified by RT-PCR in modern horticultural plantations and were not found among old trees aged more than 50 years. The genome fragments of the ACLSV, ASPV, and ASGV viruses detected were cloned and sequenced. The analysis of their nucleotide sequences gives evidence of high molecular variability generated mostly by single nucleotide substitutions and rarely by single nucleotide deletions and insertions. Recombination processes could also make some contribution to the existing genetic diversity of the virus populations studied. Estimates of selective pressure on the genome fragments of ACLSV, ASPV and ASGV obtained in this study as well as homologous sequences from the GenBank database indicate negative selection, except for one codon in the sequence of the ACLSV coat protein, which is under positive selection. The study of phylogenetic relationships between viruses isolated in different countries did not reveal any clear-cut relationship between their geographical origin and the degree of similarity of virus genome fragments.

Keywords: RT-PCR; ACLSV; ASGV; ASPV; genetic diversity; selection pressure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кузмицкая П.В., Урбанович О.Ю. Генетическое разнообразие трех вирусов яблони, выделенных в Беларуси. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):673-682. DOI 10.18699/VJ16.187

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kuzmitskaya P.V., Urbanovich O.Yu. Distribution and genetic diversity of three apple viruses in Belarus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):673-682. DOI 10.18699/VJ16.187

ORIGINAL ARTICLE

Received 11.01.2016

Accepted for publication 16.05.2016

© AUTHORS, 2016



e-mail: p.kuzmitskaya@igc.by

Яблоня – важнейшая плодовая культура, возделываемая в странах с умеренным климатом. В Беларуси она занимает большие территории в коммерческих садах и на личных приусадебных участках. Значительный ущерб данной культуре наносят заболевания вирусной этиологии, в частности вызываемые вирусом хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), вирусом борозчатости древесины яблони (ASGV) и вирусом ямчатости древесины яблони (ASPV). ACLSV, ASPV и ASGV являются членами трех различных родов семейства Flexiviridae. Они представляют собой плюс-нитевые одноцепочечные РНК-содержащие вирусы с широким спектром растений-хозяев и распространены во всех странах, где возделывается яблоня, в том числе в Беларуси. Однако генетическая структура популяций вирусов яблони, распространенных на территории страны, не исследована, не установлены филогенетические связи между ними и направления их эволюции. В связи с этим целью данного исследования была оценка генетического разнообразия вирусов ACLSV, ASPV и ASGV в старых и современных насаждениях яблони Беларуси и анализ их изменчивости.

Материалы и методы

Отбор растительного материала для анализа проводили весной и летом 2014 г. на территории Минской, Брестской, Гродненской областей и г. Минска. Исследовались образцы яблони из старых и современных садовых насаждений. В группу старых насаждений входило 126 деревьев возрастом не менее 50 лет: 29 образцов были отобраны на территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси, остальные 97 – в Минске и Минском районе в бывших приусадебных и промышленных хозяйствах. В настоящее время деревья не имеют экономической ценности, растут в естественных условиях, и уход за ними не производится. Группу современных насаждений составляли деревья из действующих маточно-черенковых и промышленных садов. Отбор растений проводили в четырех хозяйствах, расположенных на территории Минской, Гродненской и Брестской областей Беларуси.

Все протестированные яблони – 126 старых и 130 современных индивидуальных деревьев – были визуально здоровыми. В качестве положительного контроля при проведении ОТ-ПЦР использовались растения, зараженные соответствующими инфекциями. Препараты РНК были получены из фрагментов листовых пластин или почек, взятых у отдельных растений. Выделение РНК проводили с помощью набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, EU) по методике производителя. Для синтеза первой нити кДНК использовали набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, EU) согласно рекомендованному протоколу. Идентификацию вирусов ACLSV, ASGV и ASPV выполняли по методу, описанному в работе (Hassan et al., 2006). В качестве внутреннего контроля в реакции использовали амплификации гена *nad5* (Menzel et al., 2002).

Продукты амплификации разделяли в 1 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиумбромидом. В качестве маркера молекулярного веса

использовали GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, EU). Выделение продуктов амплификации производили с помощью GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, EU) в соответствии с протоколом производителя. Фрагменты геномов вирусов лигировали в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм *Escherichia coli* DH5a с помощью InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, EU) согласно рекомендациям производителя. После выращивания на LB-Amp среде из трансформантов выделяли плазмидную ДНК при помощи GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EU) согласно протоколу производителя. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13F и M13R. Для проведения реакции использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Фрагменты геномов вирусов, выделенных из образцов, взятых в качестве положительных контролей, подвергались клонированию и секвенированию совместно с протестированными образцами.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Geneious 7 (триал-версия). Помимо последовательностей, полученных в ходе выполнения данной работы, были использованы некоторые последовательности (или их фрагменты) из базы данных GenBank.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей вирусов ASGV, ASPV, ACLSV выполнено при помощи алгоритма CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Сравнительный анализ выравниваний нуклеотидных последовательностей проведен с помощью пакета программ Datamonkey (Kosakovsky Pond, Frost, 2005a). В качестве модели смещения нуклеотидных замен использована HKY85. Для поиска свидетельств рекомбинационных событий применялся метод SBP (single breakpoint recombination) (Kosakovsky Pond et al., 2006b). Алгоритмы FEL, SLAC и IFEL использованы для оценки соотношения dN/dS (или ω) каждого кодона в выравниваниях (Kosakovsky Pond, Frost, 2005b; Kosakovsky Pond et al., 2006a). Значение *p* для работы алгоритмов SLAC, FEL и IFEL принято за 0,1. Филогенетический анализ осуществлен с помощью программы Mega6 (Tamura et al., 2013). Филогенетические деревья построены методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с 1000 бутстреп-репликаций.

Результаты

Распространение вирусных инфекций среди старых и современных садовых насаждений яблони

Выявление зараженных вирусами ACLSV, ASGV и ASPV деревьев осуществлялось среди 130 индивидуальных яблонь из современных садовых насаждений, принадлежащих к 60 сортам вида *Malus domestica*, а также среди 12 сортов клоновых подвоев. Все протестированные растения не имели признаков заражения вирусными инфекциями. С помощью мультиплексной ОТ-ПЦР среди них выявлено 12 растений, зараженных ASGV (9,2 % от общего количества деревьев). Вирусом ASPV были заражены 2 яблони (1,5 %). Деревья, зараженных вирусом

хлоротической пятнистости листьев яблони, обнаружить не удалось.

Инфицированные яблони были обнаружены в Минской, Брестской и Гродненской областях. Зараженные вирусом дерева встречались как среди сортов яблони различного происхождения, так и среди клоновых подвоев (M26, 54-118). Причем среди растений одного сорта могли быть как инфицированные, так и свободные от вирусов растения.

Для оценки распространения вирусных инфекций в старых насаждениях было протестировано в общей сложности 126 индивидуальных деревьев яблони, относящихся по меньшей мере к пяти видам: *Malus × domestica*, *M. baccata*, *M. prunifolia*, *M. sachalinensis*, *M. purpureae*. По результатам тестирования методом ОТ-ПЦР среди них не выявлено деревьев, инфицированных вирусами ACLSV, ASGV и ASPV.

Молекулярная вариабельность фрагментов геномов вирусов яблони

Фрагменты генома вирусов, обнаруженных в садовых насаждениях и представленных в контрольных образцах, были секвенированы. Названия изолятов и номер доступа в GenBank представлены в табл. 1.

ACLSV

Секвенированию подвергался фрагмент генома ACLSV, содержащий участки перекрывающихся рамок считывания двигательного белка и белка оболочки вируса, а также последующий 3'-нетранслируемый регион. Длина последовательности составила 677 нуклеотидов. Нуклеотиды 1–498 полученного фрагмента соответствуют 84–581 нуклеотидам гена, кодирующего белок оболочки референсного генома NC_001409.1. Нуклеотиды 1–223 соответствуют 1096–1319 нуклеотидам гена, кодирующего двигательный белок референсной последовательности. Сравнение полученной последовательности с гомологами из базы данных GenBank показало, что ближайший гомолог со степенью идентичности 99 % (KF661401) и 100 % перекрытием был выделен из яблони сорта Антоновка, растущей в Литве. Множественное выравнивание последовательностей фрагментов гена, кодирующего белок оболочки ACLSV, свидетельствует о том, что большинство мутаций представляют собой единичные замены нуклеотидов. Инсерций и делеций длиной более 2 нуклеотидов не выявлено.

Для определения направления действия естественного отбора, в результате которого было сформировано наблюдаемое разнообразие последовательностей ACLSV, проведена оценка селекционного давления с помощью алгоритмов SLAC, FEL и IFEL. В зависимости от метода анализа было выявлено от 102 до 112 сайтов, находящихся под действием отрицательной селекции (табл. 2). Под действием положительной селекции, согласно алгоритмам SLAC, FEL и IFEL, находится кодон 9. Последний метод определил также кодон 65 как находящийся под положительной селекцией. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что эволюция вируса может происходить за счет рекомбинационных процессов. Поиск потенциальных сайтов рекомбинации с помо-

щью алгоритма SBP выявил такой сайт в позиции 105 ($p = 0,1$).

Анализ филогенетических отношений изолятов вируса, выделенных в разных странах (рис. 1), показал, что белорусский изолят ACLSV находится в близком родстве с несколькими изолятами, выделенными из яблони в Литве, а также с одним изолятом из Китая. Генетическая близость изолятов из разных стран наблюдается и в других кластерах: степень идентичности последовательностей может быть высокой у изолятов вируса, выделенных в значительно удаленных друг от друга географических регионах. Так, например, один из кластеров объединяет изоляты вирусов, выделенные из яблонь в Сербии, Литве, Канаде и Китае.

ASPV

Секвенированию подвергались фрагменты генома, кодирующие белок оболочки вируса и фрагмент последующего 3'-нетранслируемого региона. Длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 365–367 нуклеотидов. Всего было секвенировано 12 фрагментов геномов вирусов, выделенных из 9 зараженных деревьев. Максимальная степень идентичности последовательностей составила 99,7 %, минимальная – 82 %. Сравнение с референсной последовательностью генома вируса ASPVNC_003462.2 показало, что нуклеотиды 1–302 полученных последовательностей соответствуют 943–1245 нуклеотидам гена, кодирующего белок оболочки. Анализ секвенированных нами последовательностей, а также их гомологов из базы данных GenBank показал, что генетическое разнообразие было сформировано главным образом за счет однонуклеотидных замен. Поиск потенциальных сайтов рекомбинации, проведенный с помощью алгоритма SBP, выявил один сайт в позиции 70, что свидетельствует о том, что рекомбинационные процессы также вносят свой вклад в формирование молекулярной вариабельности геномов вирусов. Оценка селекционного давления выявила множество сайтов, находящихся под действием отрицательной селекции (от 82 до 84 в зависимости от использованного алгоритма, см. табл. 2), при этом сайтов, находящихся под действием положительной селекции, не выявлено.

Результаты оценки эволюционных отношений белорусских изолятов ASPV с последовательностями из других географических регионов свидетельствуют о генетической разнородности белорусской популяции вируса (рис. 2). Например, изолят KR149242 обладает большей степенью идентичности с последовательностями, выделенными в Индии и Китае, чем с другими последовательностями из Беларуси. В целом группировка ветвей филогенетического древа мало зависит от мест произрастания растений, где был выделен вирус. Например, часть последовательностей из Беларуси оказалась в близком родстве не только с фрагментами генома литовских, польских и чешских вирусов, но также с вирусами из Японии, Индии и Китая. Отдельным кластером выделяются некоторые изоляты, полученных из груши, растущей в Китае. Другие изоляты ASPV из груши находятся в более близком родстве с изолятами, выделенными из яблони, тем не менее они также группируются совместно. Примечательно, что в эту

Table 1. Isolates sequenced and their GenBank accession numbers

Virus	Isolate designation	Apple (rootstock) cultivar	Host plant origin region	GenBank acc. no.
ACLSV	Sakavita-1	Sakavita	Minsk oblast	KC244768
ASPV	ASPV_Verbnae_SMX	Verbnoe	Ditto	KP994189
	ASPV_Antey_5/6_SMX	Antey	»	KP994190
	ASPV_Belsad_12/22_SMX	Belsad	»	KP994191
	ASPV_Elena_35/27_SMX	Elena	»	KP994192
	ASPV_Elena_37/35_SMX	Elena	»	KP994193
	ASPV_SMX_Wel-1	Wealthy	»	KP994194
	ASPV_SMX_Wel-2	Wealthy	»	KP994195
	ASPV_SMX_Wel-3	Wealthy	»	KP994196
	ASPV_Vesyalina_12/13_SMX	Vesyalina	»	KP994197
	ASPV_Vesyalina_12/31_SMX	Vesyalina	»	KP994198
	ASPV_Fan_Sh-2	Champion	»	KR149242
	ASPV_Fan_Sh-1	Champion	»	KR149243
ASGV	ASGV_Fan_PSub-2	Pamyat Syubarovoy	»	KP994199
	ASGV_HPr_Sh1/5	Champion	Brest oblast	KP994200
	ASGV_Pr_54-118-1	54-118	Ditto	KP994201
	ASGV_Pr_54-118-2	54-118	»	KP994202
	ASGV_Pr_Ida1-1	Idared	»	KP994203
	ASGV_Pr_Ida2-1	Idared	»	KP994204
	ASGV_Pr_Lig-1	Ligol	»	KP994205
	ASGV_Pr_Lig-3	Ligol	»	KP994206
	ASGV_Pr_M26-1	M26	»	KP994207
	ASGV_Pr_M26-3	M26	»	KP994208
	ASGV_Pr_Sh-1	Champion	»	KP994209
	ASGV_Sch_HCri-1	Honeycrisp	Grodno oblast	KP994211
	ASGV_Sch_HCri-3	Honeycrisp	Ditto	KP994212
	ASGV_Sch_Nai-1	Naidared	»	KP994213
	ASGV_Sch_Nai-2	Naidared	»	KP994214
	ASGV_Sch_OrSin-1	Sinap Orlovskiy	»	KP994215
	ASGV_Sch_RedCr-1	Red Craft	»	KP994216
	ASGV_Sch_RedCr-2	Red Craft	»	KP994217
	ASGV_SMX_Papir-1	Papirovka	»	KP994218

Table 2. Numbers of sites under negative selection in sequences encoding envelope proteins in ACLSV, ASPV, and ASGV viruses

Method used	ACLSV	ASPV	ASGV
FEL	112	84	55
IFEL	102	86	45
SLAC	107	82	39

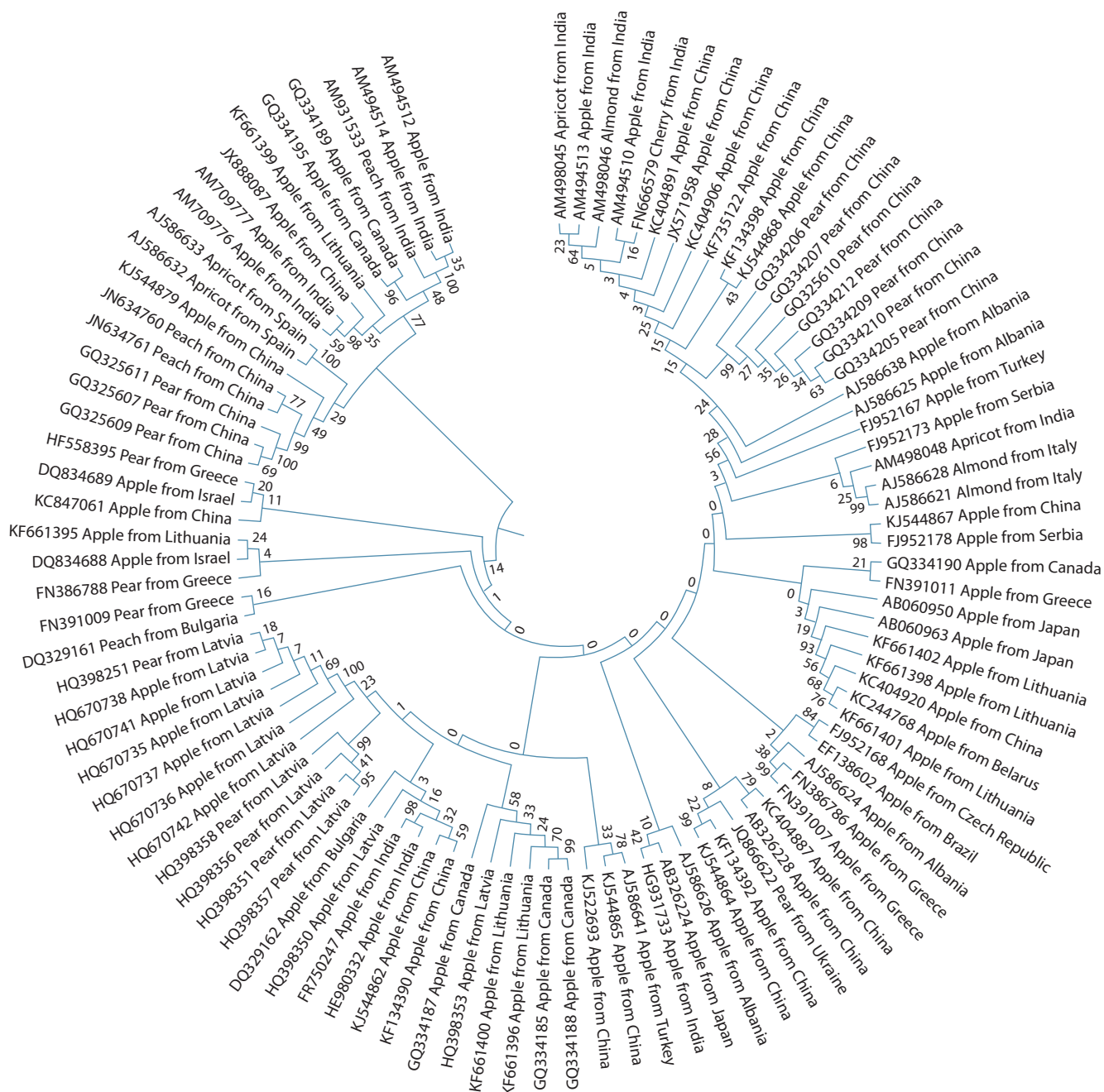


Fig. 1. Phylogenetic relationships between the Belarusian ACLSV isolate and isolates from other countries.

Here and in Fig 2 and 3: Isolate designations on the dendrogram correspond to the GenBank accession numbers. They are followed by the original host species and country of origin. Numerals on tree branches indicate bootstrap values.

группу входят изоляты, выделенные в различных географических регионах, нередко значительно удаленных друг от друга (Китай, Германия, Польша).

ASGV

Проведено секвенирование фрагментов геномов, кодирующих белок оболочки вируса. Длина полученных последовательностей составила 272–275 нуклеотидов. Полученные фрагменты гомологичны С-концевому участку 241-kDa полипротеина, кодирующему фрагмент белка

оболочки вируса, и соответствуют нуклеотидам 6005–6278 открытой рамки считывания 241-kDa полипротеина из генома NC_001749. Всего было секвенировано 19 изолятов вируса, выделенных из 12 зараженных яблонь. Степень идентичности рассматриваемых фрагментов колеблется от 96,7 до 100 %. Из них выделено две группы полностью идентичных последовательностей, каждая из которых была получена из отдельного зараженного дерева. В первую группу вошли последовательности КР994203, КР994204, КР994207, КР994213. Во вторую – последова-



Fig. 2. Phylogenetic relationships between Belarusian isolate of ASPV and the isolates from other countries.

тельности КР994209 и КР994215. Для дальнейших анализов было использовано по одной последовательности из каждой группы. Кроме того, у трех последовательностей обнаружены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. В одном случае это было вызвано делецией двух нуклеотидов (КР994202), во втором – инсерцией одного нуклеотида (КР994201); в третьем случае возникновение стоп-кодона произошло из-за однонуклеотидной замены (КР994199). В целом инсерции и делеции наблюдаются значительно реже по сравнению с однонуклеотидными заменами. Помимо этого, в формирование генетического разнообразия вируса вносят вклад рекомбинационные

процессы. Так, с помощью алгоритма SBP был найден потенциальный сайт рекомбинации в позиции 207. Оценка селекционного давления, проведенная с помощью трех алгоритмов, свидетельствует о влиянии отрицательной селекции на исследуемый участок генома вируса. В зависимости от использованного алгоритма выявлено 39–55 сайтов, находящихся под действием отрицательной селекции (см. табл. 2).

На филогенетическом древе, представленном на рис. 3, белорусские изоляты ASGV находятся в одном кластере. Наиболее близки к ним оказались последовательности, выделенные из груши в Украине. Изоляты ASGV группы-

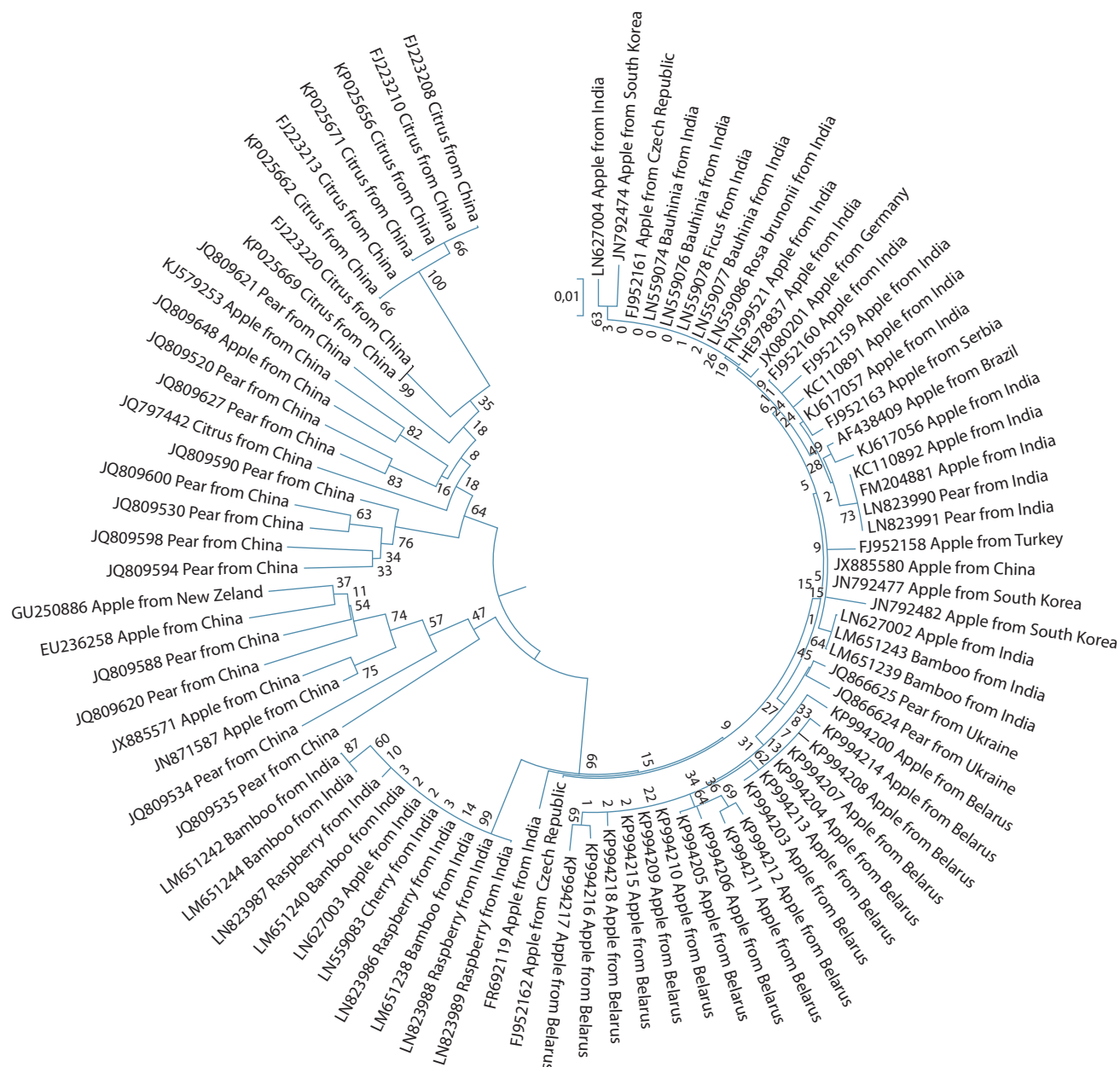


Fig. 3. Phylogenetic relationships between the Belarusian ASGV isolate and isolates from other countries.

руются в три кластера. В первый входят исключительно последовательности, выделенные в Китае из различных растений-хозяев (цитрусовых, груши, яблони). Второй кластер объединяет несколько последовательностей, выделенных из яблони и груши в Китае, а также одну последовательность из новозеландской яблони. Третий и самый большой кластер включает в себя две группы последовательностей. Одна из них представлена только последовательностями, полученными в Индии из различных растений-хозяев (малины, бамбука, вишни, яблони), другая объединяет изоляты вируса, выделенные в различных географических регионах из самых разных растений. В нее входят изоляты, выделенные в странах Европы из яблонь (Чехия, Германия, Сербия, Беларусь)

и груш (Украина), Южной Америки (один изолят из бразильской яблони), а также множество изолятов, полученных в странах Азии. Среди них последовательности из яблонь, груш, бамбука и некоторых других растений из Индии, Южной Кореи и Китая.

Обсуждение

В современных садовых насаждениях яблони в Беларуси встречаются с различной частотой вирусы ASPV, ACLSV и ASGV. Эти вирусы распространены как в соседних с Беларусью странах (Poniedziałek et al., 2001; Paduch-Cichal et al., 2005; Gospodaryk et al., 2008; Pūpolā et al., 2011; Сироткин, 2012; Stankienė et al., 2012; Yoon et al., 2014), так и в географически удаленных от нее (German

et al., 1997; Clover et al., 2003; Lovisolo et al., 2003; Shim et al., 2004; Youssef et al., 2010; Liu et al., 2014). Однако нам не удалось выявить вирусы среди старых насаждений, в которых возраст деревьев превышал 50 лет. Вероятно, заражение вирусами препятствует долголетию деревьев, и инфицированные растения погибают в более раннем возрасте. В пользу этого предположения говорит то, что зараженные растения становятся более уязвимыми к различным неблагоприятным факторам окружающей среды (Campbell, 1963; Zawadzka, 1989). Возможно также, что отсутствие вирусных инфекций в старых садовых насаждениях связано с разной технологией выращивания саженцев, применявшейся ранее и в настоящее время.

Исследованные нами фрагменты геномов вирусов яблони характеризуются довольно высокой дивергенцией. Минимальная идентичность нуклеотидных последовательностей у изолятов одного и того же вируса, выделенных на территории Беларуси, составила 82 и 96,7 % для вирусов ASPV и ASGV соответственно. Результаты других исследований также свидетельствуют о значительном генетическом разнообразии этих вирусов. Степень идентичности генов, кодирующих белок оболочки ASPV у изолятов, полученных в Польше, составляла 70,7–93,5 % (Komorowska et al., 2011). Последовательности двух геномов ACLSV, выделенных на территории Китая, имели степень идентичности 95,1 % (Niu et al., 2012). При изучении генетического разнообразия вирусов плодовых культур в Латвии обнаружено, что десять изолятов ACLSV имели степень идентичности 3'-терминальных регионов 77,5–97,4 %, девять изолятов ASPV имели степень идентичности от 60,3 до 91,4 % на нуклеотидном уровне, а фрагменты белка оболочки у девяти изолятов ASGV были идентичны на 93,7–98,9 % (Pūpolā et al., 2011).

Наше исследование показало, что одно дерево яблони может быть заражено несколькими генетическими вариантами вирусов (см. табл. 1). Так, из яблони сорта Уэлси были выделены три изолята ASPV (KP994194–KP994196), из яблони сорта Шампион – два изолята ASPV (KR149242 и KR149243). По два генетических варианта ASGV выделено из деревьев яблони сортов Лигол, Хани Крип, Найдаред, Ред Крафт, Айдаред и клоновых подвоев 54-118 и M26. В то же время в остальных случаях различий между фрагментами геномов вирусов, выделенных из одного и того же растения, выявлено не было. Случаи заражения деревьев смесью вариантов вирусов упоминались и ранее: в частности, выделение из одного дерева трех вариантов генотипа вируса ACLSV, между которыми наблюдалась высокая степень дивергенции (Candresse et al., 1995).

Высокое генетическое разнообразие РНК-содержащих вирусов объясняется высокой частотой возникновения спонтанных мутаций (10^{-6} – 10^{-4} замен на нуклеотид на одну копию генома) (Combe, Sanjuan, 2014). Поэтому популяции РНК-содержащих вирусов могут существовать в виде смеси разнообразных мутантных генотипов (Doningo, 2002). Высокая скорость мутаций геномов может рассматриваться в качестве адаптивной способности, позволяющей вирусам быстро приспосабливаться к паразитизму на разных видах в пределах царства (Schneider, Roossinck, 2001). Мутации могут приводить к возникновению нефункциональных генов, что наблюдалось нами

при секвенировании фрагментов генов, кодирующих белки оболочки ASGV. При этом все три обнаруженных изолята с нефункциональными генами имеют различные мутации.

Множественные выравнивания фрагментов геномов вирусов свидетельствуют о том, что большинство мутаций, обеспечивающих генетическое разнообразие вирусов, представляют собой однонуклеотидные замены. Инсерции и делеции нуклеотидов встречаются значительно реже. Определенный вклад могут вносить и рекомбинационные процессы. В исследованной выборке потенциальные сайты рекомбинации были обнаружены в последовательностях всех трех вирусов.

Определение селекционного давления на фрагменты геномов вирусов ACLSV, ASPV и ASGV показало, что все они находятся под действием отрицательной селекции, за исключением одного кодона у вируса хлоротической пятнистости листьев яблони. Исследования, проведенные в разных странах, свидетельствуют о доминировании отрицательной селекции в эволюции вирусов, поражающих яблоню. Однако отдельные нуклеотиды или регионы геномов вирусов могут находиться под влиянием положительной селекции (Komorowska et al., 2011; Liebenberg et al., 2012; Liu et al., 2014; Yoon et al., 2014). Возможно, такое селективное давление обусловлено участием одного вирусного белка в множестве процессов. Например, белки капсида вирусов растений помимо непосредственного формирования вирусных частиц участвуют в репликации вирусных нуклеиновых кислот, перемещении вирусных частиц от одной клетки к другой, формировании симптомов, супрессии РНК-сайленсинга, системном распространении вируса (Callaway et al., 2001; Lu et al., 2004; Yaegashi et al., 2007). Такая многофункциональность может приводить к тому, что критически важными для жизнедеятельности вируса оказываются сразу множество аминокислот в белке. Это накладывает определенные ограничения на жизнеспособность мутантных генотипов. Тем не менее существует некоторая вероятность, что часть мутантных генотипов также воспроизводится за счет функционирующих копий генома.

На направление действия естественного отбора влияют несколько факторов. Один из них – способ распространения вирусов. Показано, что у последовательностей поверхностных структурных белков трансмиссивных вирусов человека отношение dN/dS значительно ниже, чем у последовательностей вирусов, передаваемых другими способами. Сходные результаты были получены при исследовании генов, кодирующих белки оболочки растительных вирусов (Chare, Holmes, 2004). Также показано, что наличие иммунной системы у хозяина вируса влияет на направление действия естественного отбора. Согласно (Drummond et al., 2003), вирусы животных находятся под действием положительной селекции. Вероятно, отсутствие у растений подобной иммунной системы является причиной того, что для инфицирующих их вирусов нет необходимости непрерывно изменять свои поверхностные структуры.

В представленном исследовании нам не удалось обнаружить прямой зависимости между степенью дивергенции геномов вирусов и географической удаленностью

мест, где они были выделены, и таким образом проследить направление их распространения. С одной стороны, белорусский изолят ACLSV оказался близок трем изолятам из граничащей с ней Литвы (см. рис. 1), с другой – в этот же кластер вошли изоляты, выделенные из яблони в Китае, Японии, Канаде. Изоляты из граничащей с Беларусью и Литвой Латвии оказались близки изолятам из Китая и Индии. В то же время группы изолятов, выделенные из груши в Китае, находятся на максимальном расстоянии друг от друга и оказались более близки изолятам из яблони других стран.

Отсутствие непосредственной связи между степенью дивергенции вируса и географическим положением наглядно видно из дендрограммы филогенетического сходства изолятов ASPV (см. рис. 2). Так, выделенные в Беларуси изоляты вируса находятся в разных кластерах и соседствуют с изолятами как из Литвы, так и из Индии, Японии и Китая. Более компактным оказался кластер выделенных в Беларуси последовательностей ASGV (см. рис. 3). Однако к ним генетически близки не только вирусы, выделенные из груши в соседней Украине, но и вирусы, выделенные из яблони и бамбука в Индии.

Попытки найти связь между географическим происхождением и степенью идентичности фрагментов геномов вирусов растений неоднократно предпринимались исследователями различных научных центров. Однако четкой картины распределения образцов в зависимости от места отбора пробы выявить не удалось, несмотря на значительную вариабельность вирусных геномов (Liebenberg et al., 2012; Liu et al., 2014). Кластеризация изолятов в зависимости от растения-хозяина наблюдается чаще, хотя и она не является абсолютной (Komorowska et al., 2011; Liebenberg et al., 2012; Liu et al., 2014). Выявленная нами генетическая дифференциация вирусов ACLSV, ASPV и ASGV также не связана непосредственно с регионом их распространения (см. рис. 1–3).

Отчасти это может объясняться обменом посадочным материалом между странами или получением посадочного материала плодородческими учреждениями разных стран из общего источника. В этом случае распространение вирусной инфекции может происходить при вегетативном размножении растений.

Передача вирусных инфекций с помощью насекомых может быть причиной генетической схожести вирусов, выделенных из растений разных видов, но произрастающих в одном регионе. Такое распределение наблюдается для вируса ASGV (см. рис. 3). В пользу этого пути распространения заболеваний говорят результаты исследования в китайской провинции Шэньси, во время которого было обнаружено свидетельство рекомбинационных процессов между изолятами вируса ACLSV, выделенными из различных растений-хозяев (Liu et al., 2014). Однако нельзя исключить, что на степень дивергенции последовательностей вируса оказывают влияние случайные замены нуклеотидов. Возможно также, что картина формируется под действием жесткой отрицательной селекции, характерной для вирусов растений.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E.T., Sit T.L., Lommel S.A. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. Annual Review Phytopathology. 2001;39:419-460. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.419.
- Campbell A.I. The effect of some latent virus infections of the growth and cropping apples. J. Horticultural Sciences. 1963;38:15-19. DOI 10.1080/00221589.1963.11514054.
- Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowski T., Dunez J. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. Acta Horticulturae. 1995;386:136-147. DOI 10.17660/ActaHortic.1995.386.17.
- Chare E.R., Holmes E.C. Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. J. General Virology. 2004;2004:3149-3157. DOI 10.1099/vir.0.80134-0.
- Clover G.R.G., Pearson M.N., Elliot D.R., Tang Z., Smales T.E., Alexander B.J.R. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. Plant Pathol. J. 2003;52:371-378. DOI 10.1046/j.1365-3059.2003.00857.x.
- Combe M., Sanjuan R. Variation in RNA virus mutation rates across host cells. PLOS. Pathogens. 2014;10:1-7. DOI 10.1371/journal.ppat.1003855.
- Doningo E. Quasispecies theory in virology. J. Virol. 2002;76:463-465. DOI 10.1128/JVI.76.1.463-465.2002.
- Drummond A., Pybus O.G., Rambaut A. Inference of viral evolutionary rates from molecular sequences. Adv. Parasitology. 2003;54:331-358. DOI 10.1016/S0065-308X(03)54008-8.
- German-Retana S., Bergey B., Delbos R.P., Candresse T., Dunez J. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). Archives Virology. 1997;142:833-841. DOI 10.1007/s007050050122.
- Gospodaryk A., Budzanivska I., Demyanenko F., Polischuk V. Distribution of apple latent viruses in Kiev region. Vestnik Kievskogo natsionalnogo universiteta im. T. Shevchenko. Seriya Biologiya = Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. 2008;51:25-27.
- Hassan M., Myrta A., Polak J. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. J. Virological Methods. 2006;133:124-129. DOI 10.1016/j.jviromet.2005.11.002.
- Komorowska B., Siedlecki P., Kaczanowski S., Hasiów-Jaroszewska B., Malinowski T. Sequence diversity and potential recombination events in the coat protein gene of *Apple stem pitting virus*. Virus Res. 2011;158:263-267. DOI 10.1016/j.virusres.2011.03.003.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics. 2005a;21:2531-2533. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti320.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. Mol. Biol. Evol. 2005b;22(5):1208-1222. DOI 10.1093/molbev/msi105.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W., Grossman Z., Gravenor M.B., Richman D.D., Leigh Brown A.J. Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based analyses. PLOS. Computational Biology. 2006a;2(6):530-538. DOI 10.1371/journal.pcbi.0020062.
- Kosakovsky Pond S.L., Posada D., Gravenor M.B., Woelk C.H., Frost S.D.W. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. Mol. Biol. Evol. 2006b;23(10):1891-1901. DOI 10.1093/molbev/msl051.
- Liebenberg A., Moury B., Sabath N., Hell R., Kappis A., Jarausch W., Wetzel T. Molecular evolution of the genomic RNA of Apple stem grooving capillovirus. J. Mol. Evol. 2012;75(3-4):92-101. DOI 10.1007/s00239-012-9518-z.
- Liu P., Li Z., Song S., Yunfeng Wu Y. Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Shaanxi, China. Phytoparasitica. 2014;42:445-454. DOI 10.1007/s12600-013-0381-2.

- Lovisol O., Accotto G.P., Masenga V., Colaricco A. An isolate of *Apple stem grooving virus* associated with Cleopatra mandarin fruit intumescences. *Fitopatologia Brasileira*. 2003;28:54-58.
- Lu R., Folimonov A., Shinataku M., Li W.X., Falk W.B., Dawson W.O., Ding S.-W. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *PNAS*. 2004;101:15742-15747. DOI 10.1073/pnas.0404940101.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virological Methods*. 2002;99:81-92. DOI 10.1016/S0166-0934(01)00381-0.
- Niu F., Pan S., Wu Z., Jiang D., Li S. Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus persica*) in China. *Arch. Virol.* 2012;157:783-786. DOI 10.1007/s00705-011-1195-5.
- Paduch-Cichal E., Szyndel M.S., Tomala K. Preliminary results of the study on viruses occurring in 'Mutsu' apple cultivar trees. *Phytopathol. Pol.* 2005;37:87-90.
- Poniedziałek W., Nosal K., Porębski S., Banach P. Evaluation of 'Jonagold' apple trees on M9 rootstock produced in different nurseries. *Folia Horticulturae*. 2001;13/2:23-29.
- Pūpola N., Moročko-Bičevska I., Kāle A., Zeltiņš A. Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia. *J. Phytopathol.* 2011;159(9):597-605. DOI 10.1111/j.1439-0434.2011.01812.x.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4(4):406-425.
- Schneider W.L., Roossinck M.J. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virology*. 2001;75(14):6566-6571. DOI 10.1128/JVI.75.14.6566-6571.2001.
- Shim H., Min Y., Hong S., Kwon M., Kim D., Kim H., Choi Y., Lee S., Yang J. Nucleotide sequences of a Korean isolate of *Apple stem grooving virus* associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyrifolia*). *Molecular and Cells*. 2004;18:192-199.
- Sirotkin Ye.N. Apple latent virus spreading in Central Chernozem region. *AgroXXI = AgroXXI*. 2012;4-6:19-21.
- Stankienė J., Mažeikienė I., Gelvonauskienė D., Šikšnianienė J.B., Bobinas Č. Virological assessment of stock planting material of apple and raspberry cultivars. *Žemdirbystė = Agriculture*. 2012;99:93-98.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994;22(22):4673-4680. DOI 10.1093/nar/22.22.4673.
- Yaegashi H., Isogai M., Tajima H., Sano T., Yoshikawa N. Combinations of two amino acids (Ala⁴⁰ and Phe⁷⁵ or Ser⁴⁰ and Tyr⁷⁵) in the coat protein of Apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity. *J. General Virology*. 2007;88:2611-2618. DOI 10.1099/vir.0.82984-0.
- Yoon J.Y., Joa J.H., Choi K.S., Do K.S., Lim H.C., Chung B.N. Genetic diversity of a natural population of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in Korea. *Plant Pathol. J.* 2014;30(2):195-199. DOI 10.5423/ppj.nt.02.2014.0015.
- Youssef S.A., Moawad S.M., Nosseir F.M., Shalaby A.A. Detection and identification of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* affecting apple and pear trees in Egypt. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010;427:248-250.
- Zawadzka B. The influence of virus and mycoplasma diseases on frost damage of apple trees. *Acta Horticulturae*. 1989;235:59-67. DOI 10.17660/ActaHortic.1989.235.7.

Гетерозис: современные тенденции в изучении молекулярных механизмов

М.Н. Шаптуренко , Л.В. Хотылева

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

Гетерозис как феномен превосходства гибридов F_1 над родителями служит основным механизмом повышения продуктивности в сельскохозяйственном производстве, но при этом остается одним из наиболее интригующих явлений с точки зрения генетики. Первые попытки выяснения его генетических основ базировались на использовании теоретических моделей, которые, хотя и были приняты научным сообществом, но не могли в полной мере охарактеризовать это уникальное явление. С разработкой и распространением молекулярных маркеров основные усилия были направлены на поиск геномных регионов, ответственных за формирование гетеротического ответа в F_1 , и выяснение перспектив использования оценки молекулярной дивергенции исходных родительских форм для предсказания урожайного потенциала гибридного потомства. Несмотря на некоторые успехи, эффективность такого подхода для практического использования оказалась ограниченной. Выполненные исследования подтвердили, что генетическая гетерогенность необходима, но не достаточна для получения гетерозисного фенотипа. Развитие современных методологических подходов функциональной геномики и смежных дисциплин обеспечило новые возможности для изучения основополагающих механизмов гетерозиса на уровне генома, транскриптома, метаболома и эпигенома в связи с различными типами взаимодействия генов (доминированием, сверхдоминированием, эпистазом). К настоящему времени описаны различия в геномной организации, геной экспрессии и эпигенетическом статусе гибридов F_1 и их родителей. На геномном уровне обнаружены QTL, ассоциированные с гетерозисом, изучена роль дивергенции ДНК в реализации генетического потенциала F_1 . На уровне транскриптома у гибридов, по сравнению с инбредными родителями, выявлены изменения в регуляции экспрессии генов, осуществляемой с участием генов циркадных часов. Определена важная роль эпигенетической модификации ДНК и геномного импринтинга в проявлении гетерозиса. Вся совокупность данных, накопленных к настоящему времени, свидетельствует о том, что гетерозис невозможно объяснить единственным общим механизмом, так как этот сложный феномен включает множественные компоненты, кумулятивный эффект которых приводит к формированию выдающегося фенотипа.

Ключевые слова: гетерозис; молекулярные маркеры; транскрипционные факторы; циркадные ритмы; эпигенетическая регуляция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шаптуренко М.Н., Хотылева Л.В. Гетерозис: современные тенденции в изучении молекулярных механизмов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):683-694. DOI 10.18699/VJ16.188

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shapturenko M.N., Khotyleva L.V. Heterosis: current advances in the search for molecular mechanisms. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):683-694. DOI 10.18699/VJ16.188

Heterosis: current advances in the search for molecular mechanisms

M.N. Shapturenko , L.V. Khotyleva

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

Heterosis as the increased performance of hybrid progeny compared to their inbred parents is one of the most intriguing phenomena in genetics. The first attempts to find out about underlying mechanisms were based on theoretical models, which were useful, but could not characterize this unique phenomenon as a whole. With the advent of molecular markers great efforts were made to identify genomic regions causing heterotic response and clarify prospects of using information about molecular divergence of parental forms as a criterion for the prediction of F_1 performance. Despite some achievements, the effectiveness of both molecular divergence and prospective heterotic QTL for practical goals was limited, confirming that genetic heterogeneity is necessary, but not sufficient to produce perfect phenotype. Current methodological tools of functional genomics and related disciplines have provided new opportunities for searching for mechanisms of heterosis at different levels in the context of relative importance of dominance, overdominance and epistasis. To date, differences in genome organization, gene expression and epigenetic status have been found between hybrids and their parents. At the genomic level, some QTLs associated with heterosis were identified and the impact of DNA divergence on F_1 performance was evaluated. At the level of transcriptome, it was shown that heterosis in hybrids occurs along with changes in gene expression regulation under the influence of circadian clock genes. Several studies have been conducted to clarify the role of epigenetic DNA modification and genomic imprinting in the manifestation of heterosis. Taken together, data indicates that heterosis cannot be explained by a single common mechanism, because this complex phenomenon involves many components, a cumulative effect of which leads to the formation of an outstanding phenotype.

Key words: heterosis; molecular markers; transcription factors; circadian clock; epigenetic regulation.

REVIEW

Received 16.05.2016

Accepted for publication 14.07.2016

© AUTHORS, 2016

Гетерозис является фундаментальным механизмом повышения продуктивности в селекции растений, тем не менее его генетические и молекулярные основы остаются нераскрытыми. Благодаря недавнему прогрессу в функциональной геномике, эпигенетике, транскриптомике, протеомике и метаболомике, наиболее оптимальным для понимания молекулярных основ гетеротического ответа F_1 был признан системный подход. Отдельные части общего механизма, несомненно, имеют большое значение и подлежат рассмотрению, но только в контексте вероятностных событий и причинно-следственных связей на всех уровнях.

Геномный анализ гетерозиса

Классические теории рассматривают гетерозиготность гибридов F_1 как основной фактор, обуславливающий гетерозис, и в связи с этим предполагают существование линейной зависимости между генетическими дистанциями (GD) исходных родительских форм и гетеротическим ответом F_1 (Cox et al., 1984; Falconer, Mackay, 1996). Исходя из этого предположения, были предприняты попытки разработки критериев для отбора перспективных комбинаций скрещивания на основе использования различных типов маркеров (Reif et al., 2012). Исследования пшеницы (*Triticum aestivum*), овса (*Avena sativa*) и сои (*Glycine max*) подтвердили, что дивергенция между родителями, оцененная на основе коэффициента родства (Kempthorne, 1969), может быть использована для предсказания генетической вариации F_2 или последующих расщепляющихся популяций (Cowen, Frey, 1987; Manjarrez-Sandoval et al., 1997). В то же время аналогичные исследования этих видов показали, что отбор по родословным (педигри) недостаточно эффективен для обеспечения надежного предсказания. Альтернативная оценка, основанная на использовании молекулярных маркеров, была предложена M. Goodman и G. Lasker (1974) и M. Nei (1974), которые рассматривали долю несовпадений в нуклеотидных последовательностях гомологичных сайтов ДНК в качестве меры различий между генотипами, популяциями. Хотя такая оценка оказалась полезной для дифференциации генетического материала (Melchinger et al., 1998), связь между GD родителей и генетическим компонентом дисперсии потомства оказалась преимущественно слабой или незначимой, либо полученные результаты не воспроизводились в ином генофонде (Melchinger, 1998; Gumber et al., 1999; Brachi et al., 2010).

В наших исследованиях пшеницы на основе сбалансированного потомства анеуплоидов был построен дивергентный ряд, который включал дисомные линии с разной степенью фенотипической и генотипической изменчивости относительно исходного сорта Опал. Испытание этих линий в тестерных скрещиваниях и молекулярный анализ показали, что с увеличением дивергентности сила связи величины GD с гетерозисом ослабевает (Shapturenko et al., 2003). В другом исследовании, проведенном с использованием SNP-маркирования, было обнаружено, что оценка общей GD непредсказательна для отдельных признаков и требует отбора позитивных маркеров, т.е. сцепленных с соответствующими QTL. Более обнадеживающие результаты были получены при разработке

прогностических критериев отбора у овощных культур. Анализ сопряженности дивергенции родительских форм перца сладкого с компонентами урожая F_1 показал, что продуктивный потенциал гибридов циклического скрещивания обусловлен дивергенцией ISSR-локусов на 86 % и RAPD-локусов – на 69 % (Shapturenko et al., 2014). Поскольку в этом исследовании обе меры дивергенции ДНК обнаруживали тесную связь с абсолютным выражением признаков родителей, а также с продуктивностью F_1 , мы предполагаем, что часть полиморфных ДНК-фрагментов относится к гетеротическим локусам (HTL), которые могут рассматриваться как потенциальные маркеры для отбора исходного материала перца сладкого в селекции на гетерозис. Еще одно исследование, базирующееся на использовании микросателлитных маркеров, выявило тесную связь ($r = 0,71$) между GD и признаком «длина плода» у перца сладкого, что предполагает аддитивный эффект доминантных локусов. Аналогичная работа, направленная на изучение перспектив использования SSR-маркеров для предсказания генетического потенциала F_1 томата, показала, что оценка SSR-полиморфизма может быть полезна, однако имеет ограничения, так как только часть гетерозиготного преимущества F_1 может быть объяснена уровнем генетической дивергенции их родителей (Шаптуренко и др., 2014а, 2016б).

В этом исследовании для определения потенциальных гетеротических маркеров мы провели анализ комбинаций, проявлявших истинный (превосходство над лучшим из родителей) и гипотетический (превосходство над средней обоих родителей) гетерозис по целевым признакам. Такой подход позволил исключить из анализа те сочетания аллелей, которые не связаны с реализацией гетерозиса в F_1 . При оценке сопряженности GD с гетерозисом в данной выборке генотипов мы обнаружили, что суммарная оценка GD позитивно коррелировала с истинным гетерозисом на уровне 0,51–0,90 и с гипотетическим гетерозисом на уровне 0,61–0,81, в зависимости от признака. При выяснении роли дифференциального полиморфизма* родительских форм в реализации гетеротического потенциала F_1 мы обнаружили, что для общей выборки генотипов существуют достоверные положительные связи между общим числом полиморфных локусов, истинным и гипотетическим гетерозисом ($r = 0,42–0,47$), но их величина непредсказательна для отбора. В то же время дифференциальный полиморфизм в выборке гетерозисных комбинаций предопределяет превосходство гибридов F_1 над лучшим родителем и средней обоих родителей на 75 и 84 % соответственно. Число неpolиморфных локусов связано с гетерозисом обратно пропорциональной зависимостью. Высокую прогностическую ценность, согласно полученным результатам, имеет коэффициент соотношения числа полиморфных локусов к общему числу неpolиморфных локусов. Помимо этого, в нашем эксперименте наблюдался значимый вклад дифференциального полиморфизма родительских форм в константу специфической комбинационной способности, что позволяет обсуждать селекционную ценность отдельных комбинаций на основе этого показателя. Полученные ре-

* Характеризует число и соотношение полиморфных/неpolиморфных локусов в парных комбинациях скрещивания.

зультаты свидетельствуют о том, что отдельные сочетания SSR-локусов можно использовать как прогностический критерий для отбора перспективных пар скрещивания. Несмотря на отсутствие линейной зависимости между уровнем генетических дистанций и продуктивностью F_1 , хорошие перспективы применения оценки GD были показаны в наших исследованиях для капусты белокочанной (Шаптуренко и др., 2014б, 2016а) и тритикале (Орловская и др., 2012). Все отобранные комбинации скрещивания проявляли гетерозис по отношению как к средней обоих родителей, так и к лучшему из родителей. Результаты опубликованных и полученных нами данных подтверждают вывод о необходимости детализации информации о GD для ее практического использования.

Картирование QTL при помощи ДНК-маркеров обеспечило дополнительные возможности для изучения генетических детерминант количественных признаков. В исследовании C.W. Stuber с коллегами (1992), проведенном на элитном гибриде кукурузы B73 × Mo17 с использованием NC Design III, авторы картировали 11 QTL, обуславливающих гетерозис в основном за счет проявления эффекта сверхдоминирования либо псевдосверхдоминирования. Несколько позже у образцов кукурузы из разных гетеротических групп было обнаружено высокое соответствие QTL позиций в прицентромерных областях хромосом. При этом каждая группа обладает специфичными аллелями, которые в комбинации с аллелями противоположного гетеротического пула в F_1 приводят к гетерозису (Schön et al., 2010). P.A. Quijada с коллегами (2006) и J.A. Udall с коллегами (2006) при выполнении картирования QTL у *Brassica napus* L. выявили несколько общих геномных областей, в которых обнаруживались гетеротические сочетания аллелей, обуславливающие увеличение продуктивного потенциала F_1 . Другие исследователи (Chen et al., 2007; Radoev et al., 2008; Basunanda et al., 2010) определили перекрывающиеся QTL с преимущественной локализацией в «горячих» точках отдельных хромосом. Сходные данные были получены R.C. Meyer с коллегами (2010) и J. Lisec с коллегами (2009) для *Arabidopsis thaliana*, которые свидетельствуют в пользу существования ключевых, т.е. определяющих формирование гетерозиса, локусов.

В целом данные QTL исследований подтверждают мультигенную природу гетерозиса. Вероятно, развитие гетеротического ответа в F_1 обусловлено действием многих локусов с малыми эффектами, которые взаимодействуют посредством разнообразных молекулярных механизмов (Semel et al., 2006; Garcia et al., 2008).

Транскриптомный анализ гетерозиса

В транскриптомном анализе выделяют качественные и количественные различия экспрессии генов. Качественная вариация включает неаддитивную и аддитивную экспрессию родительских генов у гибрида. Качественная вариация в основном связана с сайленсингом генов в F_1 .

Несмотря на то что гибрид сочетает наследственный материал родительских форм, часто выражение различных количественных и качественных признаков F_1 превосходит уровень исходных линий. Такие отклонения в значительной мере обязаны генетической вариации,

обуславливающей изменения транскрипции в F_1 . Их выявление достаточно сложно, поскольку экспрессия генов контролируется биохимическими взаимодействиями между cis- и trans-элементами, которые в совокупности образуют сложную сеть. В связи с этим выделяют: (1) cis-вариацию, которая предполагает внутримолекулярные взаимодействия и является результатом изменений в регуляторных последовательностях ДНК, таких как энхансеры и промоторы; (2) trans-вариацию, т.е. опосредованную межмолекулярными взаимодействиями trans-регуляторных элементов (РНК, протеинов) с отдаленными генами. Каждый компонент сети взаимодействий cis- и trans-действующих факторов является потенциальной мишенью для регуляторной дивергенции. Различия в структуре геноспецифичных регуляторных сетей усложняют интерпретацию генетических эффектов, так как оказывают влияние на восприимчивость отдельных генов к некоторым видам регуляторных изменений (Wittkopp, 2005; Landry et al., 2007). Предположительно, cis- и trans-факторы транскрипции оказывают влияние на то, какие уровни экспрессии генов наследуются и реализуются в F_1 (Ronald, Akey, 2007).

Если рассматривать данные транскриптомного анализа с позиции теоретических концепций гетерозиса, то уровни экспрессии генов можно связать с генетическими понятиями «доминирование» и «сверхдоминирование», хотя такая связь весьма условна (рис. 1, а–в) (Chen, 2010). Согласно доминантной модели, экспрессия генов у гибрида обусловлена аддитивным эффектом двух аллелей родителей (рис. 1, г), тогда как сверхдоминантная модель показывает, что аллельные взаимодействия в F_1 ведут к неаддитивной экспрессии (рис. 1, д, е). При этом может наблюдаться как позитивный (рис. 1, д), так и негативный (рис. 1, е) эффект. Частным случаем доминирования является псевдосверхдоминирование (рис. 1, в), которое обусловлено неравновесием по сцеплению (linkage disequilibrium; repulsion phase linkage) (Bingham et al., 1994). В данном случае в F_1 наблюдается комплементация между тесно сцепленными доминантными аллелями и различными вредными рецессивами, локализованными на разных гомологах. Новые, отличные от родителей, аллельные комбинации в F_1 могут приводить к взаимодействиям, которые изменяют экспрессионные профили, обуславливая гетерозис.

Основываясь на собственных экспериментальных данных, а также опубликованных результатах других исследователей, Н. Zhang с коллегами (2008) предложили рабочую модель, описывающую механизм гетеротической экспрессии посредством взаимодействий между транскрипционными факторами (ТФ) и соответствующими промоторами или cis-регуляторными областями, часть из которых подвергнута INDEL-полиморфизму и теряет функциональность (рис. 2).

Согласно этой модели, транскрипционные факторы (ТФ-А, ТФ-Р) регулируют экспрессию генов-мишеней путем связывания со специфическими cis-регуляторными элементами (промоторами). Полиморфизм в cis-элементах и дифференциальная экспрессия ТФ у родительских линий так же, как их уникальная комбинация в F_1 , могут привести к пяти возможным типам действия генов

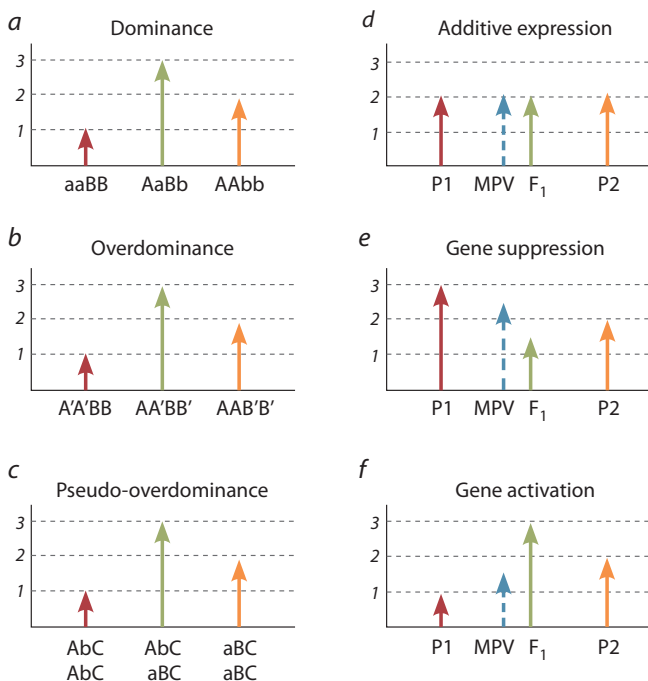


Fig. 1. Genetic models (a-c) and gene expression (d-f) in heterosis according to (Chen, 2010).

1–3, Trait expression levels for a-c and gene expression levels for d-f.

(аддитивность, отрицательное и положительное доминирование, сверхдоминирование, отрицательное сверхдоминирование).

Гибридное потомство наследует по одной копии гена от каждого из родителей. В случае аддитивной экспрессии (см. рис. 2, а) отсутствие (низкий уровень) транскрипции одного аллеля, как предполагается, может быть вызвано отсутствием или слабым связыванием транскрипционного активатора с промотором из-за мутации в *cis*-элементе. Гибриды F₁ при этом будут проявлять в экспрессии аддитивный эффект. При положительном доминировании, когда промоторы обоих родителей гомологичны, но у одного из них отсутствует (имеет низкую активность) ТФ-активатор, потомство будет иметь уровень экспрессии, соответствующий лучшему родителю. Положительное сверхдоминирование выражается в присутствии ТФ-активатора у родителя с нефункциональным промотором и его отсутствии у родителя с немутантным функциональным *cis*-элементом. Гибрид в этом случае будет иметь ТФ-А одного родителя и функциональный промотор второго, что обеспечит сверхэкспрессию гена-мишени в F₁. Сходным образом действует ТФ-репрессор, обуславливая аддитивность, отрицательное доминирование и отрицательное сверхдоминирование (см. рис. 2, б).

Н. Ding с коллегами (2014) на основе полученных результатов пришли к заключению, что большинство SNP- и INDEL-полиморфизмов так же, как и PAV (present-absent variability), относятся к вариации 5'-областей дифференциально экспрессирующихся генов. Таким образом, полиморфизм *trans*- и *cis*-регуляторных элементов так же, как и их взаимодействия, могут играть ключевую

роль в гетеротической экспрессии генов в потомстве F₁, обуславливая все возможные типы действия генов при гетерозисе.

В целом исследования механизмов экспрессии генов в F₁ не дают однозначного ответа относительно того, какие наблюдаемые изменения являются коррелятивными, причинными или предсказательными для гетерозиса. Тем не менее некоторые попытки связать уровень экспрессии генов с гетерозисом F₁ кажутся многообещающими. Результаты транскриптомного анализа, выполненного на кукурузе (Stupar, Springer, 2006; Ding et al., 2014), арабидопсисе (Vuylsteke et al., 2005) и рисе (Huang et al., 2006; Zhang et al., 2008) с использованием современных технологий генетического профилирования, показали, что при гетерозисе имеет место сложная регуляция. Если экспрессия гена, кодирующего ТФ-репрессор, подавляется, то активность других зависимых от данного репрессора генов этой сети будет восстановлена и приведет к каскадным эффектам на различных уровнях (в простейшем варианте – на генетическом, биохимическом, фенотипическом). С этой позиции транскриптомный подход вносит дополнительные нюансы в общую теорию гетерозиса с позиции причинно-следственных связей на различных уровнях организации.

Гетерозис и регуляторные сети, опосредованные действием генов циркадных часов

Многие регуляторные сети подчинены действию циркадных часов, которые координируют различные функциональные процессы в течение суточного цикла, в зависимости от смены фаз дня и ночи, регулируя суточную экспрессию по меньшей мере 30 % транскриптома, включая элементы, вовлеченные в фотосинтез и метаболизм крахмала (Harmer et al., 2000; Michael et al., 2008a, b). В этих системах осцилляция осуществляется посредством транскрипционно-трансляционных обратных связей с участием группы генов циркадных часов, организованных в сложную схему взаимодействий (рис. 3) (Pokhilko et al., 2012; Flis et al., 2015).

Компоненты дневного цикла включают MYB-связанные транскрипционные факторы *LHY* и *CCA1*, которые активируют экспрессию *PRR9*, *PRR7* и позже экспрессирующегося *PRR5*, но ингибируют *TOC1*. Факторы *PRR9*, *PRR7*, *PRR5* и *TOC1* образуют OR-комплекс, репрессирующий *LHY* и *CCA1* по принципу обратной связи (Pokhilko et al., 2010). Гены осцилляции *LHY* и *CCA1* подавляют экспрессию «вечерних» факторов *FLF3*, *FLF4* и *LUX* (*PCL1*), чьи белковые продукты взаимодействуют и формируют другой репрессор – ЕС, который, как предполагается, ингибирует *ELF4*, *ELF3* и *LUX* также по принципу обратной негативной связи (Helfer et al., 2011; Nusinow et al., 2011; Pokhilko et al., 2012). GI – крупный ритмично экспрессирующийся специфический протеин растений, функционирующий на посттрансляционном уровне посредством стабилизации *TOC1*-деградирующего фактора *ZTL* (Kim et al., 2007).

Регулирование по принципу обратной связи влияет на осцилляцию системы и зависимые механизмы, участвующие в поддержании амплитуды фаз циркадных часов (см. рис. 3, а). Нарушение осцилляторного контроля изме-

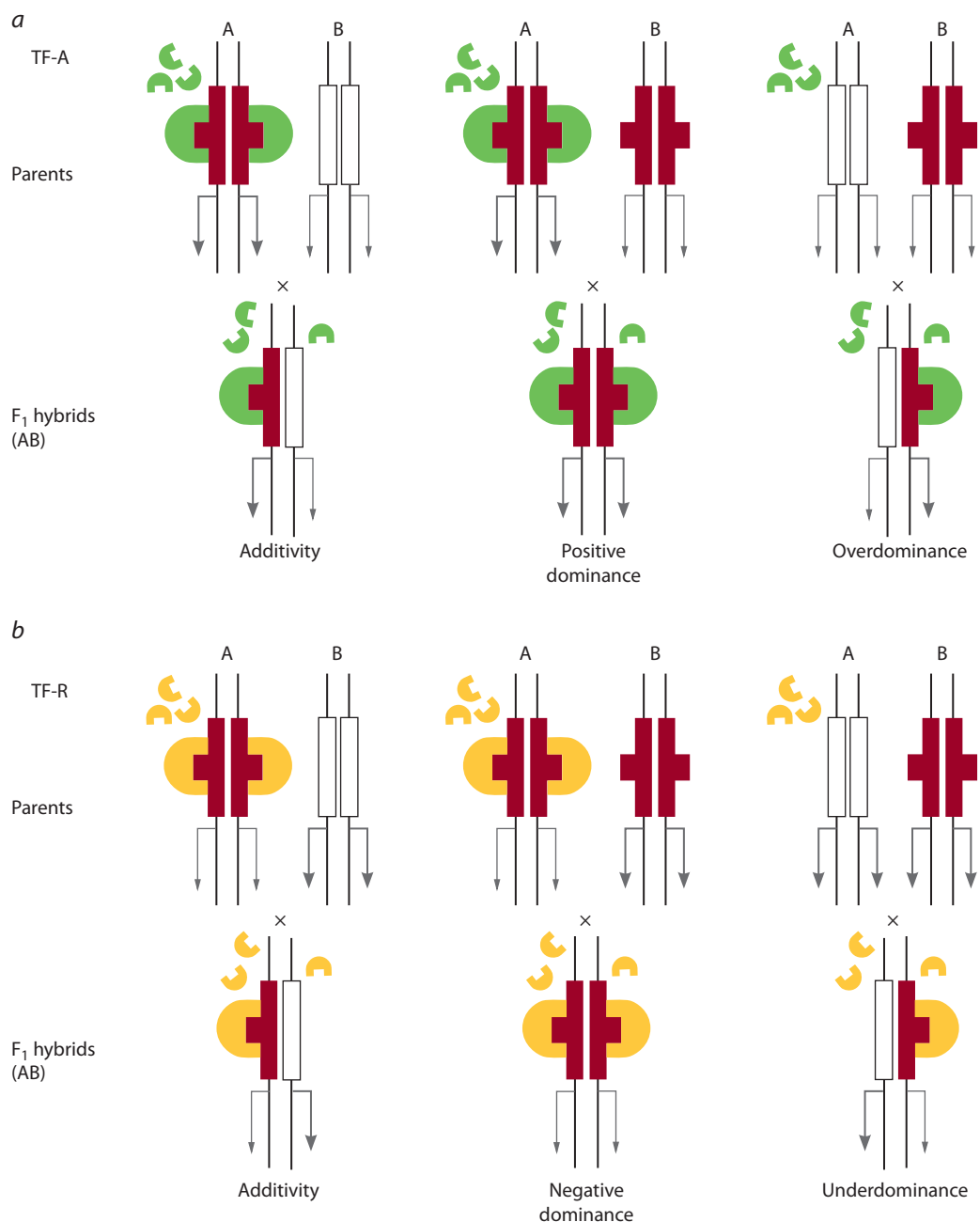


Fig. 2. Heterotic gene expression according to Zhang et al. (2008).

(a) Differential expression of a transcriptional activator (TF-A) influences the *cis* element. The overall expression level of genes in F₁ may be higher than in any parental line (overdominance), or match that in the better parent (dominance). (b) Conversely, differential expression of a transcriptional repressor (TF-R) and its action on the *cis* element may result in overall gene expression levels lower than in any parent (underdominance) or at the level of the worse parent (negative dominance).

Legend: Red box, the presence of the *cis* element; white box, absence of the *cis* element; green ellipse, trans-activator; yellow ellipse, trans-repressor; gray lines, gene transcripts.

няет экспрессию около 10 % генов *Arabidopsis*, тогда как поддержание регуляции циркадных часов на высоком уровне увеличивает фиксацию CO₂, рост и приспособительные характеристики (фитнесс) растений (Flis et al., 2015).

У арабидопсиса такие репрессоры часов, как *CCA1*, подавлены в течение дня, что обеспечивает активацию путей фотосинтеза, метаболизма углеводов, аккумуляцию

хлорофиллов, крахмала и сахаров (Ni et al., 2009; Miller et al., 2012). В результате в течение дня больше аккумулируется сахаров и крахмала, которые могут быть использованы ночью для обеспечения ростовых процессов (Graf et al., 2010; Shen et al., 2012). У супергибрида риса QTL основных компонентов урожая ассоциированы с экспрессионными изменениями генов циркадных часов

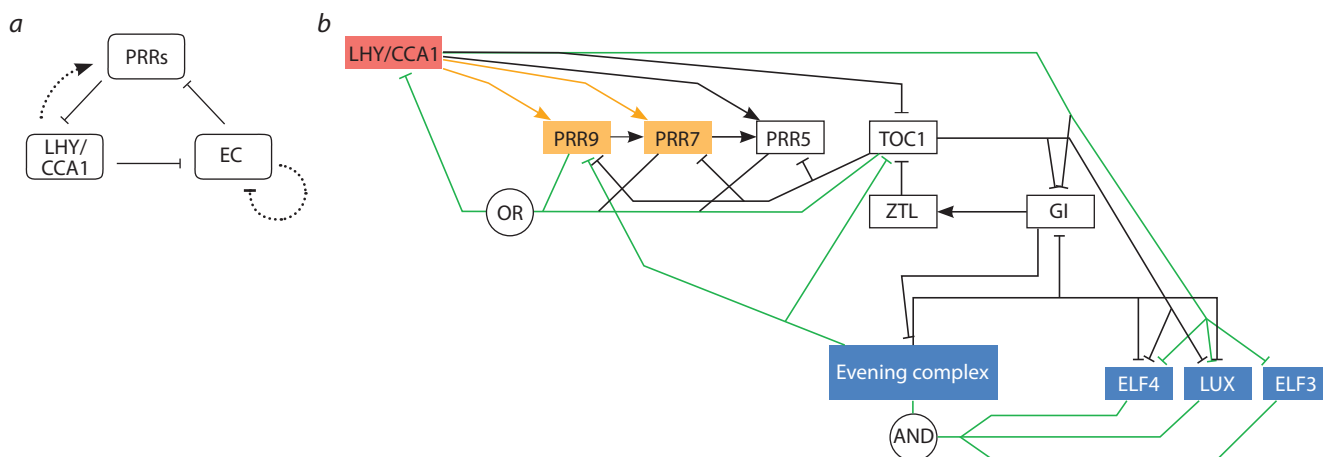


Fig. 3. Circadian clock gene networks: *a*, simple model (Pokhilko et al., 2012); *b*, detailed model (Flis et al., 2015).

LHY, late elongated hypocotyl; CCA1, circadian clock associated; PRR, pseudo-response regulator; TOC, timing of cab expression; GI, gigantea; ZTL, zeitlupe; ELF, early flowering; LUX, lux arrhythmo or phytochrome 1; EC, evening complex. Repressors, green lines; morning components, yellow; evening components, blue.

и световых сигнальных путей (Song et al., 2010). G. Shen с коллегами (2015) при проведении сравнительного анализа линий и реципрокных гибридов риса (*indica* × *indica*, *indica* × *japonica*, *japonica* × *japonica*) показали, что F₁ с урожайностью на уровне лучшего родителя имеют повышенную энергоаккумулирующую способность, которая пропорциональна экспрессии нижележащих в сети генов относительно генов циркадных часов, что согласуется с данными R.Q. Fang с коллегами (2013). Изменение экспрессионных пиков генов циркадных часов может также влиять на такие биологические механизмы, как стрессоустойчивость, работа генов сигнальных путей фитогормонов, регулирование иммунитета растений, выражаемое в синхронизации защитного ответа с циркадным поведением насекомых, суточными ритмами патогенов (Mikkelsen, Thomashov, 2009; Wang et al., 2011; Goodspeed et al., 2012).

Уровень экспрессии генов циркадных часов у гибридов влияет на зависимые признаки и может приводить к более мощному росту. Механизм изменения амплитуды, вероятно, связан с модификациями гистонов. Как показано для *A. thaliana*, циркадная осцилляция в генной экспрессии происходит параллельно осцилляции модификаций гистонов H3K56ac, H3K9ac, H3K4me3, H3K4me2 (Malapeira et al., 2012). Это можно трактовать как модификацию хроматина, ведущую к репрессии или активации циркадных регуляторов, что, в свою очередь, изменяет экспрессию опосредованных их действием генов. Таким образом, связанное с изменением амплитуды циркадных ритмов увеличение экспрессии генов циркадных часов и зависимых генетических факторов цепи у гетеротических гибридов по сравнению с экспрессией инбредных родителей поддерживает модель мультигенного гетерозиса с позиции энергоэффективного использования и быстрой прогрессии эндогенных процессов, при которых гибриды развиваются более эффективно, чем исходные родительские формы. Все это свидетельствует о значимой роли амплитуды осцилляций циркадных часов для формирования гетеротического ответа гибридов F₁.

Эпигенетические факторы и гетерозис

В последних исследованиях гетерозиса немаловажное значение придается эпигенетическим эффектам, которые регулируют транскрипцию, дифференцировку клеток и неменделевское наследование. У растений наследуемые эпигенетические изменения в большей степени связаны с метилированием ДНК, которое чаще всего обнаруживается в повторяющихся последовательностях, транспозонах, промоторных и межгенных областях, псевдогенах и внутригенных регионах и может охватывать до 1/3 всех конститутивно экспрессирующихся генов, содержащих динуклеотиды CG (Zhang et al., 2006). Многие исследования подтвердили, что эпигенетические эффекты, включая метилирование цитозина (mC) ДНК, могут быть причастны к проявлению гетерозиса (He et al., 2013). Эпигенетика способна объяснить один из наиболее интересных вопросов, связанный с проявлением значимого гетеротического эффекта в F₁ от генетически сходных родителей. Экспериментальные данные показывают, что родители с высоким сходством геномов могут иметь значительные различия в эпигеноме, что может быть существенным для формирования гетеротических фенотипов.

Исследования гибридов кукурузы выявили различия в шаблонах метилирования в сравнении с исходными родительскими линиями (Zhao et al., 2007). Аналогично, у риса уровень дифференциального метилирования инбредов коррелировал с транскрипционными изменениями в F₁ (He et al., 2010). H. Shen с коллегами (2012), осуществив полногеномное mC-профилирование линий Ler-0, C24 *A. thaliana* и их реципрокных гибридов, обнаружили, что уровень ДНК-метилирования в F₁ повышен. При изучении этих же линий I.K. Greaves с коллегами (2012) выявили 23 % различий, в которых наибольшая вариация соответствовала CNN-последовательностям внутригенных и фланкирующих областей, а уровень CNN-метилирования оказался значимо ниже, чем в среднем у родителей.

В наших исследованиях статуса метилирования в двух группах гетерозисных гибридов перца сладкого, полу-

ченных в независимых диаллельных схемах скрещивания, было обнаружено снижение числа метилированных локусов в F_1 как в дифференциально метилированных областях, так и в локусах со сходным эпигенетическим статусом (Шаптуренко и др., 2015). Общее число неметилированных локусов в F_1 было ассоциировано ($r = 0,65$) с гипотетическим гетерозисом по признаку «масса плодов с растения», тогда как влияние метилированных локусов оказалось недостоверным. При этом уровень детерминации (r^2) гипотетического гетерозиса эпигенетическим статусом dMet (деметилирование) в первой группе достигал 82 %. Интересен тот факт, что один из лучших гибридов характеризовался отсутствием метилирования во всех проанализированных локусах относительно родителей и при этом показал наиболее высокий гетерозисный эффект. Во второй группе гибридов также наибольшее значение ($r = 0,91$) имело снижение эффекта метилирования по ряду локусов и несколько меньший вклад ($r = 0,86$) привносило метилирование *de novo*. Существование тесных связей между гетерозисом и числом метилированных/неметилированных локусов свидетельствует о том, что гибридизация обуславливает возникновение эпигенетических модификаций гибридного генома, которые связаны с метилированием ДНК, либо снятием его эффекта – деметилированием. Такие модификации влияют на функциональное состояние различных генов, вызывая каскадные реакции в генных сетях, которые, в свою очередь, могут приводить к оптимальному протеканию метаболизма и способствовать формированию гетеротического ответа на уровне гибридного генома.

У гибридов риса значительное число локусов метилировано неаддитивно (He et al., 2010). При этом реципрокные гибриды различаются числом таких локусов, хотя в среднем около 75 % из них имеют повышенный уровень метилирования. Преобладание локусов с повышенным уровнем mC также обнаружено у гибридов *A. thaliana*, а неаддитивные эффекты в F_1 соответствуют локусам, дифференциально метилированным между родителями (Groszmann et al., 2011b). В обоих случаях, и у риса и у арабидопсиса, такое локус-специфическое увеличение уровня метилирования в отношении средней обоих родителей (mid parental value, MPV) свидетельствует о *trans*-хромосомном эффекте, при котором присутствие гиперметилированного аллеля вызывает метилирование гомолога. Хотя у обеих культур наблюдается тенденция к увеличению mC (метилцитозина) в неаддитивных локусах, выявляется значимая доля локусов со сниженным уровнем метилирования, что также можно интерпретировать как *trans*-хромосомный эффект (Groszmann et al., 2011b). В целом такие *trans*-эффекты можно рассматривать в контексте парамутаций, когда доминантный парамутационный аллель, эквивалентный «лучшему» родителю, индуцирует изменения в экспрессионном состоянии парамутабельного аллеля, т. е. эквивалентного «слабому» родителю.

Эпигенетическая регуляция транскрипции в геноме осуществляется при помощи класса малых РНК, включающих интерферирующие РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) и *trans*-действующие siRNA (ta-siRNA) (Chapman, Carrington, 2007; Chen, 2009). Биогенез основной

группы 24-нуклеотидных siRNA у растений зависит от РНК полимеразы IV (Pol IV), РНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (RDR2) и эндонуклеазы DICER-LIKE 3 (DCL3). Эти РНК взаимодействуют с ARGONAUT4 (AGO4), что приводит к метилированию (RdDM – RNA directed DNA methylation) в локусе-мишени и сайленсингу генов (Law, Jacobsen, 2010; Haag, Pikaard, 2011). Большинство siRNA происходят от TEс и повторяющихся элементов и, следовательно, дивергируют между видами и отдельными линиями. Действительно, с siRNA связаны различия между аллотетраплоидами, гибридами F_1 и исходными родительскими линиями (He et al., 2010; Groszmann et al., 2011a; Barber et al., 2012; Shen et al., 2012), которые обусловлены изменениями шаблонов экспрессии (Ng et al., 2012). Как показано на рекомбинантных изогенных линиях (RIL), некоторые si- и miRNA вовлечены в процессы, обуславливающие формирование трансгрессивных фенотипов (Shivaprasad et al., 2012). Эти данные подтверждают их потенциальную роль в реализации гетеротического ответа в F_1 .

М. Groszmann с коллегами (2011a) показали, что изменения в экспрессии генов гибридов связаны с локус-специфическим метилированием, обусловленным ta-siРНК. В данном случае при объединении гамет в F_1 siРНК одного родителя находят новые мишени в геноме или транскриптоме противоположного родителя. Вызываемые этими взаимодействиями изменения влияют на уровни экспрессии в F_1 (Ong-Abdullah et al., 2015). Следовательно, ері-аллельная вариабельность может влиять на развитие организма, его функциональные свойства, а также обуславливать гетерозис в F_1 .

Как показали многочисленные исследования, локусы с измененными уровнями siRNA часто связаны с конститутивно экспрессирующимися генами (Groszmann et al., 2011a). Это говорит о том, что изменение активности немногих генов, подвергшихся эпигенетическим изменениям, может привести к каскадным эффектам в генной сети и способствовать гетерозису. Действительно ли эти изменения обуславливают гетерозис, зависит от конкретных ері-аллелей, присутствующих у родителей. Согласно М. Groszmann с коллегами (2011a), изменение ері-аллелей у гибридов вследствие изменения уровней siRNA, TCM (trans-chromosomal methylation), или TCdM (trans-chromosomal demethylation) может соответствовать классическим генетическим моделям доминирования и сверхдоминирования, что указывает на необходимость рассмотрения действия ері-аллелей в отношении механизмов гибридной силы. Основываясь на собственных и опубликованных экспериментальных данных, М. Groszmann с коллегами (2011a) заключили, что транскрипционная активность каждого аллеля опосредована состоянием хроматина, определяемого эпигенетическими модификациями, в том числе связанными с действием siRNA. Авторы выделили несколько возможных взаимодействий в гибридном эпигеноме, отличающихся от ожидаемого среднего родительских линий (рис. 4).

1. Отсутствие siRNA, ассоциированной с гиперметилированным Р₁-аллелем, приводит к аддитивному эффекту, что выражается в уровне транскрипции, соответствующему среднему обоих родителей.

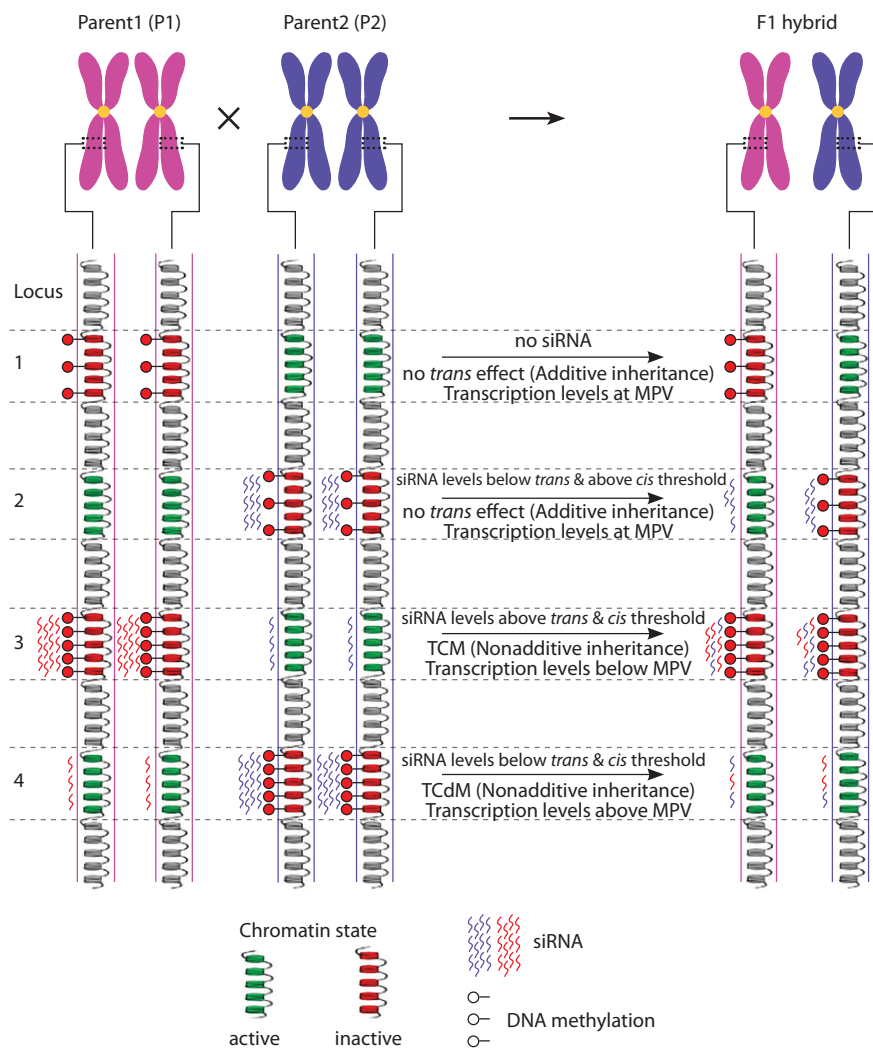


Fig. 4. Model of inheritance of locus-specific siRNA and DNA methylation levels in the F₁ hybrid (Groszmann et al., 2011).

2. siRNA ассоциирована с метилированным P₂-аллелем. Унаследованные от P₂ siRNA действуют на оба аллеля на уровне, достаточном для поддержания метилирования P₂-аллеля, но недостаточном для преодоления порога, определяемого активным состоянием P₁-аллеля. Таким образом, родительские аллели в F₁ сохраняют исходный эпигенетический статус, что также приводит к аддитивному наследованию.
3. Полученные гибридом от P₁ siRNA ассоциированы с обоими аллелями. Их активность превышает пороговый уровень, позволяет поддерживать метилирование P₁-аллеля, а также осуществлять *de novo* метилирование P₂ аллеля, что приводит к сайленсингу. В результате TCM транскрипционный уровень гибрида оказывается ниже среднего родителей.
4. Наследуемая от P₂ siRNA ассоциируется в F₁ с обоими аллелями. Такая ко-ассоциация приводит к снижению уровня активности siRNA в каждом аллеле ниже порога, необходимого для поддержания метилирования и, как следствие, – к деметилированию обоих аллелей. Наблюдаемое неаддитивное наследование обусловлено TCdM, которое приводит к повышению уровня транскрипции в сравнении с родителями.

У гибридов риса и арабидопсиса выявляется значимая доля локусов с редуцированным уровнем метилирования. Локализованное неаддитивное снижение метилирования наблюдается у рекомбинантных изогенных линий

A. thaliana. Это подтверждает, что TCdM обусловлено взаимодействием родительских еpi-аллелей и не зависит от различий в нуклеотидных последовательностях (Reinders et al., 2009). Предположительно, для проявления гетерозиса наибольшее значение имеет TCdM, которое обеспечивает повышение транскрипционного уровня и, как следствие, может приводить к более высокому выражению зависимых признаков. Снижение гетерозиса в последующих поколениях также можно объяснить с точки зрения эпигенетики. С одной стороны, это происходит в результате разрушения гетеротических агрегаций аллелей, с другой, в последующих поколениях еpi-аллели, оказываясь в измененном генетическом окружении, могут меняться посредством тех же механизмов, которые ответственны за изменение эпигенома F₁.

К одному из возможных механизмов регуляции гетерозиса относят геномный импринтинг (англ. parent-of-origin эффект), при котором дифференциальная экспрессия генов зависит от принадлежности аллелей к материнскому или отцовскому типу (Garnier et al., 2008; Bauer, Fischer, 2011). Использование РНК-Seq и кДНК-AFLP позволило выявить большое число кандидатов на роль импринтированных генов как по материнскому (iMEGs), так и по отцовскому (iPEGs) типам у однодольных культур *Zea mays*, *Oryza sativa* (Luo et al., 2011; Waters et al., 2011) и *A. thaliana* (Wolff et al., 2011). У растений большинство примеров импринтинга наблюдается в ткани эндосперма (Jullien, Berger, 2009; Springer, Gutierrez-Marcos, 2009). В некоторых случаях обнаруживается параллелизм событий для разных культур, при котором выявляется импринтинг ортологов, как показано для кукурузы, риса и арабидопсиса (Waters et al., 2011). Важным и, возможно, основным компонентом регулирования импринтинга также является ДНК-метилирование, обуславливающее реорганизацию хроматина. В ряде исследований, выполненных на различных культурах, наблюдалось практически полное деметилирование материнского генома в тканях эндосперма (Lauria et al., 2004; Ze-

mach et al., 2010; Hsieh et al., 2011). Многие из таких областей соответствуют мобильным элементам (Gehring et al., 2009; Zemach et al., 2010). Предположительно, деметилирование в эндосперме необходимо для усиления эффекта сайленсинга мобильных элементов в прилегающей эмбриональной ткани (Springer, 2009; Mosher, Melnyk, 2010). В дополнение к ДНК-метилированию существуют доказательства участия в регуляции импринтинга группы Polycomb-протеинов, модифицирующих гистоны (Köhler, Weinhofer-Molisch, 2010; Raissig et al., 2011).

В настоящее время нет единого мнения о причинах возникновения импринтинга. С точки зрения молекулярной биологии, этот феномен может быть связан с большой группой *pol IV*-зависимой siRNAs (*p4 siRNAs*), так как эти интерферирующие РНК передаются от матерей (Mosher et al., 2009). В исследованиях *A. thaliana* было показано, что экспрессия материнских *p4 siRNAs* негативно коррелирует с экспрессией группы *AGL (AGAMOUS-LIKE)* генов, кодирующих транскрипционный фактор MADS-box, который экспрессируется в эндосперме и влияет на размер семян (Lu et al., 2012). Реципрокные гибриды выявили *parent-of-origin* эффект в уровне экспрессии генов *AGL* и, соответственно, в размере семян. Как предполагают авторы, различия между родителями в siRNA и статусе метилирования при объединении их генетического материала в F_1 приводят к возникновению у гибридов метилирования *de novo* через RdDM. Эпигенетические модификации, включая RdDM и гистоновые метки на родительских аллелях, могут обеспечивать «память», которая приводит к *parent-of-origin* эффектам в экспрессии и может влиять на формирование гетеротического фенотипа, как наблюдалось у реципрокных гибридов *A. thaliana*. В исследованиях Р. Ryder с коллегами (2014), ориентированных на изучение эффекта полиплоидизации и гибридизации, была подтверждена роль *parent-of-origin* эффекта в проявлении гетерозиса гибридами *A. thaliana*. Некоторые модуляции выявлялись при скрещивании форм с одинаковым уровнем плоидности, тогда как другие соотносились только с межплоидными скрещиваниями.

Закключение

Совокупность исследований, выполненных на разных видах растений при изучении феномена гетерозиса, свидетельствует о сложной иерархии связей и взаимодействий между многочисленными компонентами генетических сетей, действие которых приводит к каскадным эффектам, затрагивающим эпигеном, транскриптом, протеом и метаболом, а, следовательно, и эффективность работы всех систем, обуславливая формирование гетеротического ответа в F_1 .

Очевидно, что гетерозис должен рассматриваться как результат сложных взаимодействий, которые приводят к комплексу изменений на уровне генных, эпигенетических, биохимических и регуляторных сетей. Такой подход связывает генетическую составляющую с биохимическими механизмами и служит основой интеграции данных полногеномных исследований, транскриптомики, эпигеномики, протеомики и метаболомики для построения всеобъемлющих генетической и математической моделей, описывающих механизмы формирования гетеротического

ответа в F_1 и позволяющих выявлять ключевые факторы для прикладного использования в селекции.

Acknowledgments

This study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, project B14-131.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Barber W.T., Zhang W., Win H., Varala K.K., Dorweiler J.E., Hudson M.E., Moose S.P. Repeat associated small RNAs vary among parents and following hybridization in maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012;109:10444-10449. DOI 10.1073/PNAS.1202073109.
- Basunanda P., Radoev M., Ecke W., Fridt W., Becker H.C., Snowdon R.J. Comparative mapping of quantitative trait loci involved in heterosis for seedling and yield traits in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2010;120:271-281. DOI 10.1007/s00122-009-1133-z.
- Bauer M.J., Fischer R.L. Genome demethylation and imprinting in the endosperm. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011;14:162-167. DOI 10.1016/J.PBI.2011.02.006.
- Bingham E.T., Groose R.W., Woodfield D.R., Kidwell K.K. Complementary gene interactions in alfalfa are greater in autotetraploids than diploids. *Crop Sci.* 1994;34:823-829. DOI 10.2135/cropsci1994.0011183X003400040001x.
- Brachi B., Faure N., Horton M., Flahauw E., Vazquez A., Nordborg M. Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000940. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000940>.
- Chapman E.J., Carrington J.C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8:884-896. DOI 10.1038/nrg2179.
- Chen W., Zhang Y., Liu X.P., Chen B.Y., Tu J.X., Fu T.D. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (*Brassica napus*) using DH and immortalized F2 population. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(6):849-858. DOI 10.1007/s00122-007-0613-2.
- Chen X. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009;25:21-44. DOI 10.1146/annurev.cellbio.042308.113417.
- Chen Z.J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.* 2010;15(2):57. DOI 10.1016/j.tplants.2009.12.003.
- Cowen N.M., Frey K.J. Relationship between genealogical distance and breeding behaviour in oats (*Avena sativa* L.). *Euphytica.* 1987;36(2):413-424. DOI 10.1007/BF00041484.
- Cox T., Kiang Y., Gorman M., Rodgers D. Relationship between coefficient of parentage and genetic similarity indices in the soybean. *Crop Sci.* 1984;25:529-532. DOI 10.2135/cropsci1985.0011183X002500030023x.
- Ding H., Qin Ch., Luo X., Li L., Ch Z., Liu H., Gao J., Lin H., Shen Y., Zhao M., Lübberstedt Th., Zhang Zh., Pan G. Heterosis in early maize ear inflorescence development: a genome-wide transcription analysis for two Maize inbred lines and their hybrid. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:13892-13915. DOI 10.3390/ijms150813892.
- Falconer D.S., Mackay T.F. Introduction to quantitative Genetics. London: Longman Group Ltd, 1996.
- Fang R.Q., Li L.Y., Li J.X. Spatial and temporal expression modes of microRNAs in an elite rice hybrid and its parental lines. *Planta.* 2013;238(2):259-269. DOI 10.1007/s00425-013-1881-5.
- Flis A., Fernández A.P., Zielinski T., Mengin V., Sulpice R., Stratford K., Hume A., Pokhilko A., Southern M.M., Seaton D.D., McWatters H.G., Stitt M., Halliday K.J., Millar A.J. Defining the robust behaviour of the plant clock gene circuit with absolute RNA time-series and open infrastructure. *Open Biol.* 2015;5(10):150042. DOI 10.1098/rsob.150042.

- Garcia A.A., Wang S., Melchinger A.E., Zeng Z.B. Quantitative trait loci mapping and the genetic basis of heterosis in maize and rice. *Genetics*. 2008;180:1707-1724. DOI 10.1534/genetics.107.082867.
- Garnier O., Laouielle-Duprat S., Spillane C. Genomic imprinting in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008;626:89-100.
- Gehring M., Bubbs K.L., Henikoff S. Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science*. 2009;324(5933):1447-1451. DOI 10.1126/science.1171609.
- Goodman M., Lasker G. Measurement of distance and propinquity in anthropological studies. Eds. J. Crow, C. Denniston. *Genetic Distance*. New York: Plenum Press, 1974;5-21. DOI 10.1007/978-1-4684-2139-2_2.
- Goodspeed D., Chehab E., Min-Venditti A., Braam J., Covington M. *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012;109(12):4674-4677. DOI 10.1073/pnas.1116368109.
- Graf A., Schlereth A., Stitt M., Smith A. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010;107:9458-9463. DOI 10.1073/pnas.0914299107.
- Greaves I.K., Groszmann M., Ying H., Taylor J.M., Peacock W.J., Dennis E.S. Trans chromosomal methylation in *Arabidopsis* hybrids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012;109:3570-3575. DOI 10.1073/pnas.1201043109.
- Groszmann M., Greaves I.K., Albert N., Fujimoto R., Helliwell C.A., Dennis E.S., Peacock W.J. Epigenetics in plants – vernalisation and hybrid vigour. *Biochem. Biophys. Acta*. 2011a;1809:427-437. DOI 10.1016/j.bbaggm.2011.03.006.
- Groszmann M., Greaves I.K., Albert N., Scofield G.N., Peacock W.J., Dennis E.S. Changes in 24-nt siRNA levels in *Arabidopsis* hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011b;108(6):2617-2622. DOI 10.1073/pnas.1019217108.
- Gumber R.K., Schill B., Link W., von Kittlitz E., Melchinger A.E. Mean, genetic variance, and usefulness of selfing progenies from intra- and inter-pool crosses in faba beans (*Vicia faba* L.) and their prediction from parental parameters. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:569-580. DOI 10.1007/s001220051106.
- Haag J.R., Pikaard C.S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011;12(8):483-492. DOI 10.1038/nrm3152.
- Harmer S.L., Hogenesch J.B., Straume M., Chang H.-S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*. 2000;290(5499):2110-2113. DOI 10.1126/science.290.5499.2110.
- He G., He H., Wang Deng X. Epigenetic variations in plant hybrids and their potential roles in heterosis. *J. Genet. Genomics*. 2013;40(5):205e210. DOI 10.1016/j.jgg.2013.03.011.
- He G.M., Zhu X.P., Elling A.A., Chen L.B., Wang X.F., Guo L., Liang M.Z., He H., Zhang H.Y., Chen F.F., Qi Y.J., Chen R.S., Deng X.W. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*. 2010;22:17-33. DOI 10.1105/tpc.109.072041.
- Helfer A., Nusinow D.A., Chow B.Y., Gehrke A.R., Bulyk M.L., Kay S.A. LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Curr. Biol.* 2011;21:126-133. DOI 10.1016/j.cub.2010.12.021.
- Hsieh T.F., Shin J., Uzawa R., Silva P., Cohen S., Bauer M.J., Hashimoto M., Kirkbride R.C., Harada J.J., Zilberman D., Fischer R.L. Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011;108(5):1755-1762. DOI 10.1073/pnas.1019273108.
- Huang Y., Zhang L., Zhang J., Yuan D., Xu C., Li X., Zhou D., Wang S., Zhang Q. Heterosis and polymorphisms of gene expression in an elite rice hybrid as revealed by a microarray analysis of 9198 unique ESTs. *Plant Mol. Biol.* 2006;62:579-591. DOI 10.1007/s11103-006-9040-z.
- Jullien P.E., Berger F. Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009;12(5):637-642. DOI 10.1016/j.pbi.2009.07.004.
- Kemphorne O. *An Introduction to Genetic Statistics*. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press, 1969.
- Kim W.Y., Fujiwara S., Suh S.S., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam H.G., Somers D.E. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*. 2007;449(7160):356-360. DOI 10.1038/nature06132.
- Köhler C., Weinhofer-Molisch I. Mechanisms and evolution of genomic imprinting in plants. *Heredity*. 2010;105(13):57-63. DOI 10.1093/jxb/ers145.
- Landry C.R., Lemos B., Rifkin S.A., Dickinson W.J., Hartl D.L. Genetic properties influencing the evolvability of gene expression. *Science*. 2007;317:18-21. DOI 10.1126/science.1140247.
- Lauria M., Rupe M., Guo M., Kranz E., Pirona R., Viotti A., Lund G. Extensive maternal DNA hypomethylation in the endosperm of *Zea mays*. *Plant Cell*. 2004;16(2):510-522. DOI 10.1105/tpc.017780.
- Law J.A., Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 2010;11:204-220. DOI 10.1038/nrg2719.
- Lisec J., Steinfath M., Meyer R.C., Selbig J., Melchinger A.E., Willmitzer L., Altmann T. Identification of heterotic metabolite QTL in *Arabidopsis thaliana* RIL and IL populations. *Plant J.* 2009;59(5):777-788. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2009.03910.x.
- Lu J., Zhang C., Baulcombe D.C., Chen Z.J. Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of *Arabidopsis* seeds. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012;109:5529-5534. DOI 10.1073/pnas.1203094109.
- Luo M., Taylor J.M., Spriggs A., Zhang H., Wu X., Russell S., Singh M., Koltunow A. A genome-wide survey of imprinted genes in rice seeds reveals imprinting primarily occurs in the endosperm. *PLoS Genet.* 2011;7(6):e1002125. DOI 10.1371/journal.pgen.2011.7(6):e1002125.
- Malapeira J., Khatova L.C., Mas P. Ordered changes in histone modifications at the core of the *Arabidopsis* circadian clock. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012;109(52):21540-21545. DOI 10.1073/pnas.1217022110.
- Manjarrez-Sandoval P., Carter T.E., Webb D.M., Burton J.W. RFLP genetic similarity estimates and coefficient of parentage as genetic variance predictors for soybean yield. *Crop Sci.* 1997;37(3):698-703. DOI 10.2135/cropsci1997.0011183X003700030002x.
- Melchinger A.E., Gumber R.K., Leipert R.B., Vuylsteke M., Kuiper M. Prediction of testcross means and variances among F₃ progenies of F₁ crosses from testcross means and genetic distances of their parents in maize. *Theor. Appl. Genet.* 1998;96(3-4):503-512. DOI 10.1007/s001220050767.
- Meyer R.C., Kusterer B., Lisec J., Steinfath M., Becher M., Scharr H., Melchinger A.E., Selbig J., Schurr U., Willmitzer L., Altmann T. QTL analysis of early stage heterosis for biomass in *Arabidopsis*. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(2):227-237. DOI 10.1007/s00122-009-1074-6.
- Michael T.P., Breton G., Hazen S.P., Priest H., Mockler T.C., Kay S.A., Chory J. A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol.* 2008a;6(9):e225. DOI 10.1371/journal.pbio.0060225.
- Michael T.P., Mockler T.C., Breton G., McEntee C., Byer A., Trout J.D., Hazen S.P., Shen R., Priest H.D., Sullivan C.M., Givan S.A., Yanovsky M., Hong F., Kay S.A., Chory J. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet.* 2008b;4(2):e14. DOI 10.1371/journal.pgen.0040014.
- Mikkelsen M.D., Thomashow M.F. A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2009;60(2):328-339. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2009.03957.x.
- Miller M., Zhang Ch., Chen Z.J. Ploidy and hybridity effects on growth vigor and gene expression in *Arabidopsis thaliana* hybrids and their parents. *G3: Genes. Genomes. Genetics*. 2012;2(4):505-513. DOI 10.1534/g3.112.002162.
- Mosher R.A., Melnyk C.W. siRNAs and DNA methylation: Seedy epigenetics. *Trends Plant Sci.* 2010;15(4):204-210. DOI 10.1016/j.tplants.2010.01.002.
- Mosher R.A., Melnyk Ch.W., Kelly K.A., Dunn R.M., Studholme D.J., Baulcombe D.C. Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs

- in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature*. 2009;460:283-286. DOI 10.1038/nature08084.
- Nei M. A new measure of genetic distance. Eds. J. Crow, C. Denniston. Genetic Distance. New York: Plenum Press, 1974;63-76.
- Ng D., Lu J., Chen Z. Big roles for small RNAs in polyploidy, hybrid vigor, and hybrid incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012; 15(2):154-161. DOI 10.1016/j.pbi.2012.01.007.
- Ni Z.F., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J.X., Zhang Y.R., Sun Q.X., Chen Z.J. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature*. 2009;457:327-331. DOI 10.1038/nature07523.
- Nusinow D.A., Helfer A., Hamilton E.E., King J.J., Imaizumi T., Schultz T.F., Farré E.M., Kay S.A. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*. 2011;475:398-402. DOI 10.1038/nature10182.
- Ong-Abdullah M., Ordway J.M., Jiang N., Ooi S.-E., Kok S.-Y., Sarpan N., Azimi N., Hashim A.T., Ishak Z., Rosli S.K., Malike F.A., Bakar N.A., Marjuni M., Abdullah N., Yaakub Z., Amiruddin M.D., Nookiah R., Singh R., Low E.-T., Chan K.-L., Azizi N., Smith S.W., Bacher B., Budiman M.A., Brunt A., Wischmeyer C., Beil M., Hogan M., Lakey N., Lim C., Arulandoo X., Wong C., Choo Ch., Wong W., Kwan Y., Alwee S., Sambanthamurthi R., Martienssen R. Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. 2015;525:533-537. DOI 10.1038/nature15365.
- Orlovskaya O.A., Koren L.V., Khotyleva L.V. Impact of parents genetic divergence on heterosis of F₁-hybrids of spring triticale. *Ekologicheskaya genetika = Ecological genetics* (Saint-Petersburg). 2012;X(3):3-9. (in Russian)
- Pokhilko A., Fernandez A.P., Edwards K.D., Southern M.M., Halliday K.J., Millar A.J. The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Mol. Syst. Biol.* 2012; 8:574. DOI 10.1038/msb.2012.6.
- Pokhilko A., Hodge S.K., Stratford K., Knox K., Edwards K.D., Thomson A.W., Mizuno T., Millar A.J. Data assimilation constrains new connections and components in a complex, eukaryotic circadian clock model. *Mol. Syst. Biol.* 2010;6:416. DOI 10.1038/msb.2010.69.
- Quijada P.A., Udall J.A., Lambert B., Osborn T.C. Quantitative trait analysis of seed yield and other complex traits in hybrid spring rapeseed (*Brassica napus* L.): Identification of genomic regions from winter germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113(3):549-561. DOI 10.1007/s00122-006-0323-1.
- Radoev M., Becker H.C., Ecke W. Genetic analysis of heterosis for yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus* L.) by quantitative trait locus mapping. *Genetics*. 2008;179(3):1547-1558. DOI 10.1534/genetics.108.089680.
- Raissig M.T., Baroux C., Grossniklaus U. Regulation and flexibility of genomic imprinting during seed development. *Plant Cell*. 2011; 23(1):16-26. DOI 10.1105/tpc.110.081018.
- Reif J.C., Hahn V., Melchinger A.E. Genetic basis of heterosis and prediction of hybrid performance. *Helia*. 2012;35(57):1-8. DOI 10.2298/hel1257001r.
- Reinders J., Wulff B., Mirouze M., Mari-Ordonez A., Dapp M., Rozhon W., Bucher E., Theiler G., Paszkowski J. Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic *Arabidopsis* epigenomes. *Gene Dev.* 2009;23(8):939-950. DOI 10.1101/gad.524609.
- Ronald J., Akey J.M. The evolution of gene expression QTL in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*. 2007;2:e678. DOI 10.1371/journal.pone.0000678.
- Ryder P., McKeown P.C., Fort A., Spillane Ch. Epigenetics and heterosis in crop plants. *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications. Transcriptional Regulation and Chromatin Remodeling in Plants*. Eds. R. Alvarez-Venegas, C. De la Pena, J.A. Casas-Mollano. 2014;X:13-31.
- Schön C.C., Dhillon B.S., Utz H.F., Melchinger A.E. High congruency of QT position for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(2):321-332. DOI 10.1007/s00122-009-1209-9.
- Semel Y., Nissenbaum J., Menda N., Zinder M., Krieger U. Over-dominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006;103(35):12981-12986. DOI 10.1073/pnas.0604635103.
- Shapturenko M.N., Jakimovich A.V., Zabara Yu.M., Khotyleva L.V. The contribution of molecular-genetic divergence to F₁ hybrid performance of white cabbage. *Doklady NAN Belarusi = Reports of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2014b;58(5):80-86. (in Russian)
- Shapturenko M., Kudelko L., Yatsevich A., Khotyleva L.V. Formation of new original material based on the genetic heterogeneity of the disomic offspring of aneuploids wheat plant. *Russ. J. Genet.* 2003; 39(11):1265-1270. DOI 10.1023/B:RUGE.00000004142.24920.d3.
- Shapturenko M.N., Pechkovskaya T.V., Vakula S.I., Jakimovich A.V., Zabara Yu. M., Khotyleva L.V. Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(1):51-56. DOI 10.18699/VJ16.133. (in Russian)
- Shapturenko M.N., Tarutina L.A., Mishin L.A., Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. DNA divergence as a criterion of a Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) selection for heterosis. *Russ. J. Genet.* 2014; 50(2):138-146. DOI 10.1134/S1022795414020148.
- Shapturenko M.N., Tarutina L.A., Mishin L.A., Kubrak S.V., Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. Prediction of F₁ progeny variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) from parental divergence assessed by SSR markers. *Ekologicheskaya genetika = Ecological genetics* (Saint-Petersburg). 2014a;XII(3):3-11. (in Russian)
- Shapturenko M.N., Tarutina L.A., Mishin L.A., Kubrak S.V., Kilchevsky A.V., Khotyleva L.V. Association of differential DNA polymorphism in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and the heterotic potential of F₁ hybrids. *Doklady NAN Belarusi = Reports of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2016b; 50(5):101-107. (in Russian)
- Shapturenko M., Vakula S., Tarutina L., Mishin L., Khotyleva L. MSAP-analysis of differential DNA methylation of lines and F₁ hybrids of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Materialy II Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Genetika i biotekhnologiya XXI veka: problemy, dostizheniya, perspektivy»*. Minsk, Belarus (13-16 oktyabrya 2015) [Proc. 2nd Int. Sci. Conf. "Genetics and biotechnology of the XXI century: problems, achievements, and prospects". Minsk, Belarus (13-16 October 2015)]. Minsk, Tekhnologiya Publ., 2015. (in Russian)
- Shen G., Hu W., Zhang B., Xing Y. The regulatory network mediated by circadian clock genes is related to heterosis in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 2015;57(3):300-312. DOI 10.1023/B:RUGE.00000004142.24920.d3.
- Shen H., He H., Li J. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*. 2012;24(3):875-892. DOI 10.1105/tpc.111.094870.
- Shivaprasad P.V., Dunn R.M., Santos B.A., Bassett A., Baulcombe D.C. Extraordinary transgressive phenotypes of hybrid tomato are influenced by epigenetics and small silencing RNAs. *EMBO J.* 2012; 31(2):257-266. DOI 10.1038/emboj.2011.458.
- Song G.S., Zhai H.L., Peng Y.G., Zhang L., Wei G., Chen X.Y., Xiao Y.G., Wang L., Chen Y.J., Wu B., Chen B., Zhang Y., Chen H., Feng X.J., Gong W.K., Liu Y., Yin Z.J., Wang F., Liu G.Z., Xu H.L., Wei X.L., Zhao X.L., Ouwerkerk P.B., Hankemeier T., Reijmers T., van der Heijden R., Lu C.M., Wang M., van der Greef J., Zhu Z. Comparative transcriptional profiling and preliminary study on heterosis mechanism of super-hybrid rice. *Mol. Plant*. 2010;3(6):1012-1025. DOI 10.1093/mp/ssq046.
- Springer N.M. Small RNAs: How seeds remember to obey their mother. *Curr. Biol.* 2009;19(15):649-651. DOI 10.1016/j.cub.2009.06.049.
- Springer N.M., Gutierrez-Marcos J. Imprinting in maize. *The Maize Handbook*. Eds S. Hake, J. Bennetzen. New York: Springer, 2009: 429-440.

- Stuber C.W., Lincoln S.E., Wolff D.W., Helentjaris T., Lander E.S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*. 1992;132:823-839.
- Stupar R.M., Springer N.M. Cis-transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F₁ hybrid. *Genetics*. 2006;173:2199-2210. DOI 10.1534/genetics.106.060699.
- Udall J.A., Quijada P.A., Lambert B., Osborn T.C. Quantitative trait analysis of seed yield and other complex traits in hybrid spring rapeseed (*Brassica napus* L.): Identification of alleles from unadapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:597-609. DOI 10.1007/s00122-006-0324-0.
- Vuylsteke M., Eeuwijk F., Hummelen P., Kuiper M., Zabeau M. Genetic analysis of variation in gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2005;171:1267-1275. DOI 10.1534/genetics.105.041509.
- Wang W., Barnaby J., Tada Y., Li H., Tör M., Caldelari D., Lee D., Fu X., Dong X. Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*. 2011;470:110-114. DOI 10.1038/nature09766.
- Waters A.J., Makarevitch I., Eichten S.R., Swanson-Wagner R.A., Yeh C.-T., Xu W., Schnable P.S., Vaughn M.W., Gehring M., Springer N.M. Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm. *Plant Cell*. 2011;23:4221-4233. DOI 10.1105/tpc.111.092668.
- Wittkopp P.J. Genomic sources of regulatory variation in *cis* and in *trans*. *Cell Mol. Life Sci.* 2005;62:1779-1783. DOI 10.1007/s00018-005-5064-9.
- Wolff P., Weinhofer I., Seguin J., Roszak P., Beisel C., Donoghue M., Spillane C., Nordborg M., Rehmsmeier M., Köhler C. High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the Arabidopsis endosperm. *PLoS Genet.* 2011;7:e1002126. DOI 10.1371/journal.pgen.1002126.
- Zemach A., Kim M.Y., Silva P., Rodrigues J.A., Dotson B., Brooks M.D., Zilberman D. Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010;107:18729-18734. DOI 10.1073/pnas.1009695107.
- Zhang H., Hea H., Chen L., Li L., Liang M., Wang X., Liu X., He G., Chen R., Ma L., Deng X.W. A genome-wide transcription analysis reveals a close correlation of promoter INDEL polymorphism and heterotic gene expression in rice hybrids. *Mol. Plant*. 2008;1(5):720-731. DOI 10.1093/mp/ssn022.
- Zhang X.Y., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan S.W.L., Chen H.M., Henderson I.R., Shinn P., Pellegrini M., Jacobsen S.E., Ecker J.R. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis. *Cell*. 2006;126(6):1189-1201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.003>.
- Zhao X.X., Chai Y., Liu B. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Sci.* 2007;172:930-938. DOI 10.1016/j.plantsci.2007.01.002.

Филогенетические связи между палеоарктическими видами *Anopheles* комплекса *maculipennis* (Diptera: Culicidae), установленные при использовании разных методов. Проблема консенсуса

О.В. Ваулин¹✉, Ю.М. Новиков²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», кафедра цитологии и генетики, Томск, Россия

Выяснение филогенетических отношений в близкородственных группах эпидемиологически значимых организмов – важная задача паразитологии и эволюционной теории. Одной из таких групп является комплекс видов *Anopheles maculipennis*, распространенных в Евразии, Северной Африке и Северной Америке. Изучены опубликованные схемы филогенеза палеоарктической части этого комплекса, построенные на основе скрещиваемости видов, исследования политенных хромосом, изоферментов, кутикулярных углеводов и ITS2 генов рРНК. Отсутствие высокого соответствия между ними обусловило идею создания консенсусной схемы филогенетических связей указанной группы видов. С помощью различных алгоритмов (Neighbor-joining, Minimum Evolution, Maximum Parsimony и Maximum Likelihood) построены филогенетические схемы по последовательностям фрагмента гена COI, варибельного участка D2 28S рДНК и ITS2 генов рРНК. Обоснованы, построены и обсуждены две консенсусные схемы филогении палеоарктических видов *maculipennis*. Одна из них опирается в основном на результаты молекулярно-генетического анализа. Вторая создана на основе исследования политенных хромосом, географического распространения и экологии. Филогенетические связи *An. beklemishevi* противоречивы. По молекулярным маркерам *An. beklemishevi* близок к другим палеоарктическим видам, однако далек от них по фиксированным хромосомным инверсиям. Показана удаленность этого вида от группы неоарктических видов ветви *An. quadrimaculatus*. Предложенные схемы отображают два возможных сценария эволюции комплекса *maculipennis*. Различия между ними обусловлены как принятыми в качестве аргументов фактами и рассуждениями, так и допущениями различных методов реконструкции филогенеза. Выдвинута идея о существенной роли несоответствия астрономического и биологического времени в интерпретации эволюционных процессов. Для более детального решения проблемы филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* требуется расширение знаний о видах, его составляющих.

Ключевые слова: комплекс видов *Anopheles maculipennis*; виды-двойники; экологическая ниша; географическое распространение; филогения; эволюция; хромосомные инверсии; ITS2; варибельный участок D2 28S рДНК; ПЦР.

Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus

O.V. Vaulin¹✉, Yu.M. Novikov²

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

² Tomsk State University, Department of Cytology and Genetics, Tomsk, Russia

A study of phylogenetic relationships in closely related groups of epidemically important species is an important task of parasitology and evolutionary theory. One of these species groups is the *maculipennis* complex, with its members widespread in Eurasia, North Africa and North America. We studied phylogenetic schemes of the Palaearctic part of this Complex, which are based on crossability of species, polytene chromosomes, isoenzymes, cuticular hydrocarbons and ITS2 of rRNA genes. The lack of high compliance between them prompted us to create a consensus scheme of phylogenetic relationships in the Palaearctic part of this Complex. We constructed phylogenetic schemes on the sequences of a COI gene fragment, the D2 variable region of 28S rDNA and ITS2 of rRNA genes using various algorithms (Neighbor-joining, Minimum Evolution, Maximum parsimony and Maximum likelihood). Two consensus schemes of the Palaearctic branch of the *maculipennis* complex were constructed, validated and discussed. The first scheme was based mostly on molecular genetics data. The second scheme relies on polytene chromosome, geographical spread and ecological data. Phylogenetic relationships of *An. beklemishevi* are contradictory. This species is similar to other Palaearctic species by molecular markers but it is far from them by fixed chromosome inversions. It was shown that this species is distant from Neoarctic species of the *An. quadrimaculatus* branch. The proposed schemes show two possible scenarios of the *maculipennis* complex evolution. Differences between them are explained by facts and associated speculations as

well as by assumptions made under different phylogenetic reconstruction methods. A hypothesis about a significant role of the disparity between the astronomical and biological times in the interpretation of evolutionary processes was proposed. To address the phylogeny problem of the Palaearctic branch of the maculipennis complex at a more detailed level, it is required to increase our knowledge about the underlying species.

Key words: *Anopheles maculipennis* complex; sibling species; ecological niche; geographic distribution; phylogeny; evolution; chromosomal inversions; ITS2; D2 variable region of 28S rDNA; PCR.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ваулин О.В., Новиков Ю.М. Филогенетические связи между палеоарктическими видами *Anopheles* комплекса *maculipennis* (Diptera: Culicidae), установленные при использовании разных методов. Проблема консенсуса. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):695-703. DOI 10.18699/VJ16.189

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Phylogenetic relationships between Palaearctic species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) revealed by different approaches and markers. The problem of consensus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):695-703. DOI 10.18699/VJ16.189

Особенностью рода *Anopheles*, свидетельствующей о его эволюционной динамичности, является обилие групп близкородственных видов, в частности видов-двойников. Соответственно задачам систематики, состав групп и филогенетические связи между видами пересматривают и уточняют с появлением новых методов и маркеров, позволяющих выявлять хиатусы. Уточнение классификации *Anopheles* актуально в связи с тем, что многие представители рода являются эффективными переносчиками малярийных плазмодиев (Gentile et al., 2004; Marrelli et al., 2006).

Комплекс *Anopheles maculipennis* является группой в высокой степени сходных видов. Многие из них не удается идентифицировать ни морфологическим, ни цитогенетическим методами. Виды этого комплекса населяют северное полушарие от Британии и Средиземноморья до Дальнего Востока (палеоарктическая группа) и от восточного до западного побережья США и Канады (неоарктическая группа) (Kitzmiller et al., 1967; White, 1978; Стегний, 1991; Ramsdale, Snow, 2000). Эти виды отличаются между собой, равно как и от других видов рода *Anopheles*, по климатическим условиям обитания, степени тяготения к среде обитания человека и пищевым предпочтениям.

В соответствии с их физиологическими и поведенческими особенностями они имеют разное эпидемиологическое значение. Так, из двух сосуществующих отдаленно родственных видов *An. sacharovi* и *An. superpictus* к переносу *Plasmodium vivax* более способен первый (Kasap, 1990). Из двух членов палеоарктической группы комплекса *maculipennis* там, где они симпатричны, *An. atroparvus* имеет большую склонность быть переносчиком *P. vivax*, чем *An. messeae* (Takken et al., 2002). Таким образом, восприимчивость разных видов комаров к возбудителям малярии не демонстрирует зависимости от их филогенетической близости. Возникает вопрос о природе и качестве тех характеристик, которые будут адекватно отражать степень родства между ними. Пищевое поведение комаров, их ассоциация с человеческим окружением или природными местообитаниями и другие экологические особенности

могут быть перспективными в качестве элементов таких характеристик (Lanzaro, Lee, 2013).

К настоящему времени предложено несколько схем филогенеза палеоарктической группы видов комплекса *maculipennis* (White, 1978; Bianchi et al., 1980; Стегний, 1991; Marinucci et al., 1999; Новиков и др., 2004). Высокого соответствия между ними нет. Сложность в установлении филогенетических связей между видами, составляющими комплекс, возрастает и в связи с выделением его новых членов (Новиков, 1984; Новиков, Шевченко, 2001; Sedaghat et al., 2003; Гордеев и др., 2004).

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ схем филогенеза, как представленных в литературных источниках, так и построенных авторами настоящей работы (экспериментальная часть исследования приведена в Доп. материалах 1–3*), и создание консенсусной схемы филогении палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*.

Филогения палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*

Варианты реконструкций и отсутствие согласия между ними

Первая попытка выявить и систематизировать филогенетические связи видов комплекса *maculipennis* была предпринята J.B. Kitzmiller с коллегами (1967). Исследователи провели целый ряд опытов по гибридизации видов, параллельно изучая политенные хромосомы особей, принадлежащих к скрещиваемым видам и гибридам F₁, а также оценивая жизнеспособность гибридов. По результатам исследования в комплексе были выделены четыре ветви: 1. палеоарктическая (*An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. sacharovi*, *An. maculipennis*, *An. subalpinus* (в настоящее время – синоним вида *An. melanoon*) и *An. messeae*); 2. freeborni (*An. freeborni*, *An. aztecus*, *An. occidentalis*, *An. earlei*); 3. *An. quadrimaculatus*; 4. *An. punctipennis*.

* Дополнительные материалы см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20/appx4.pdf>

J.B. Kitzmiller с коллегами (1967) сделали вывод о низкой степени постзиготической репродуктивной изоляции между гомосеквентными видами *An. atroparvus* и *An. labranchiae* и несколько более высокой изоляции между гомосеквентными *An. maculipennis* и *An. subalpinus*. Самки, полученные от скрещиваний ♀ *An. labranchiae* × ♂ *An. atroparvus*, давали потомство от беккроссов с самцами *An. atroparvus*. По мнению авторов, к скрещиваниям с неоарктическими видами комплекса наиболее способен *An. atroparvus*. Это стало аргументом для его помещения в основание филогенетического древа палеоарктических видов. Порядок, отражающий расстояние видов от *An. atroparvus*, был следующий: *atroparvus* (*labranchiae*) → *maculipennis* → *subalpinus* → *sacharovi* → *messeae*. Авторы отметили, что схема показывает не последовательность происхождения видов, а лишь степень их сходства.

В работе J.B. Kitzmiller с коллегами (1967) не были изучены прекопулятивные изолирующие механизмы; для палеоарктической группы видов степень родства была оценена главным образом на основе скрещиваний с самцами *An. atroparvus*. Результаты реципрокных скрещиваний при гибридизации видов часто различаются (Lewontin, 1974). Аллопатричные виды скрещиваются легче, чем симпатричные, что и наблюдали J.B. Kitzmiller с коллегами (1967), но не придали этому значения. Так, *An. subalpinus* легче скрещивался с *An. messeae*, чем с *An. maculipennis*. Более эффективная репродуктивная изоляция симпатричных видов, наиболее вероятно, связана с их физиологической и экологической, нежели генетической дивергенцией. Следовательно, сама по себе степень репродуктивной изоляции не может быть аргументом для вывода о родственных связях видов. Очевидно, что филогенетическая близость видов связана со степенью сходства их генетического аппарата, в частности рисунка дисков политенных хромосом.

Анализ политенных хромосом в палеоарктической ветви комплекса позволил выявить новый вид – *An. beklemishevi* – и доказать валидность таксона *An. martinius* (Стегний, 1976; Стегний, Кабанова, 1976). Цитогенетические данные позволили построить схему филогенеза (см. рис. 6 в (White, 1978)), отличающуюся от схемы в работе J.B. Kitzmiller с коллегами (1967).

По мнению G.B. White (1978), ветвь североамериканских членов комплекса дифилетична: группа *freeborni* наиболее близка к *An. beklemishevi*, а *An. punctipennis* более родствен с *An. atroparvus*. Присутствующий в схеме *An. sicaulti* оказался группой североафриканских популяций, конспецифичных с *An. labranchiae* (Zulueta, 1983; Laboudi et al., 2011).

В.Н. Стегний (1991) высказал точку зрения о происхождении большинства палеоарктических видов *maculipennis* от *An. freeborni*, независимом отделении *An. beklemishevi* от *An. earlei* и его проникновении в Северную Евразию. Постулировано *a priori*, что «генераторами видообразования» являются мономорфные виды с небольшими ареалами (Стегний, 1991), что, вероятно, является результатом замещения идеи о ключевой роли в процессе видообразования **мономорфной части геномов** видов (Алтухов, 1974; Carson, 1975) идеей о более высоких видообразовательных потенциях **мономорфных видов**.

Следует отметить, что для хорошо изученного высоко полиморфного по хромосомным инверсиям комплекса *Anopheles gambiae* эволюционные события, связанные с преобразованиями кариотипов, исследователи представляли себе по-разному. Так, в одном из первых исследований предковой формой назван *An. quadriannulatus* (Coluzzi et al., 1979). Позже цитогенетические реконструкции были признаны малоэффективными в сравнении с результатами анализа ДНК, в связи с возможностью интрогрессии и параллельного возникновения идентичных инверсий (Besansky et al., 1994). М. Kamali с коллегами (2012) на основе молекулярного анализа районов, прилегающих к инверсиям, пришли к выводу, что предковой формой является *An. melas*.

Проблемой филогенетических построений на основе хромосомных перестроек является проблематичность представлений об их возникновении. Так, реконструируя филогенез, исследователи традиционно опирались на идею о монофилетичности возникновения хромосомных инверсий (Kitzmiller et al., 1967; Dobzhansky, 1970; White, 1978; Стегний, 1991). Вместе с тем это допущение противоречит мутационной теории, согласно которой любая мутация может возникать неоднократно, а также фактам обнаружения реинверсии в природной популяции *Chironomus plumosus* (Ильинская, 1977) и повторного возникновения идентичных хромосомных перестроек у *Drosophila melanogaster* (Коваленко и др., 2006). Следовательно, филогенетические построения, основанные на различиях между видами только по фиксированным хромосомным инверсиям, могут быть далеки от действительности. Факты и соображения, приведенные выше, позволяют сделать вывод о возможности существования инверсионных полиморфизмов, общих для разных видов, что соответствует представлениям о том, что полиморфизмы к видообразованию прямого отношения не имеют (Алтухов, 1974; Carson, 1975).

Следующий этап в изучении филогении палеоарктической группы наступил с привлечением метода анализа полиморфизма растворимых белков и ферментов. Этим методом было исследовано семь видов комплекса: *An. sacharovi*, *An. labranchiae*, *An. atroparvus*, *An. messeae*, *An. melanoon*, *An. maculipennis* и *An. subalpinus* (Bianchi et al., 1980). Авторы заключили, что ранее всех от предковой формы отделился *An. sacharovi*, затем *An. atroparvus* и *An. labranchiae*, после чего предковая форма разделилась на две ветви, одна из которых содержала *An. messeae* и *An. subalpinus*, другая – *An. maculipennis* и *An. melanoon*.

Эта филогенетическая схема противоречит ряду других схем. Наиболее существенным противоречием является помещение конспецифичных форм *An. subalpinus* и *An. melanoon* (Стегний и др., 1984) в разные кластеры. Внутривидовая изменчивость изоферментов оказалась сопоставимой с межвидовой, что существенно снижает надежность схем, построенных на основе изоферментного анализа. Отмеченное противоречие и аналогичные данные по другим группам близких видов (Lewontin, 1974) выступают дополнительными аргументами в пользу идеи о том, что внутривидовой полиморфизм не имеет отношения к видообразованию (Алтухов, 1974; Carson, 1975).

Еще одна схема филогении палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* была основана на результатах анализа кутикулярных углеводов (Phillips et al., 1990). Таксономический статус анцестральной формы, как и в статье А.Р. Bianchi с коллегами (1980), в этой работе также не ясен. По мнению авторов, от предковой формы ранее всех остальных видов отделился *An. atroparvus*, после чего исходная форма последовательно дала начало *An. labranchiae*, *An. messeae* и разделилась на *An. maculipennis* и *An. melanoon*. Критическое отношение к этой схеме вызывают наличие в ней только пяти видов и отсутствие кластера *An. atroparvus*/*An. labranchiae*, уверенно выделяющегося в схемах, построенных с использованием других маркеров.

Новый этап в изучении таксономии и филогении палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* начался с применением методов молекулярной генетики. С помощью таксопринтного анализа (Новиков, Шевченко, 2001) был подтвержден сделанный ранее вывод о том, что таксон *An. messeae* s.l. не является единым полиморфным видом, а состоит из двух криптических видов (А и В) с параллельными инверсионными полиморфизмами (Новиков, 1984).

Другим эффективным подходом к диагностике видов комплекса *maculipennis* стал анализ последовательности ITS2. На его основе дифференциация между криптическими видами А и В *An. messeae* была также установлена (Новиков и др., 2004). Кроме того, он позволил выявить новые палеоарктические виды: *An. persiensis* (Sedaghat et al., 2003), *An. artemievi* (Гордеев и др., 2004) и *An. daciae* (Nicolescu et al., 2004). Отсутствие между *An. messeae* А и *An. daciae* существенных морфологических отличий, идентичность их последовательностей ITS2, а также тот факт, что последовательности ITS2 *Anopheles messeae* s.l. из северной Италии, исследованные и предоставленные в базу данных ДНК EMBL М. Di Luca с коллегами (2004), могут быть отнесены только к *An. messeae* А и *An. daciae*, стали основой вывода о консpezifичности *An. daciae* и *An. messeae* А (Ваулин, Новиков, 2010). Так как северная Италия – это типовое местообитание *An. messeae* (Falleroni, 1926), то *An. messeae* А и *An. daciae* соответствуют этому виду по исходному описанию.

Определенные сложности сопровождали описание *An. artemievi*. Цитогенетический анализ среднеазиатской формы *An. sacharovi* показал ее самостоятельность и валидность ранее описанного вида *An. martinius* (Стегний, 1976). Позже была определена нуклеотидная последовательность ITS2 образцов, в соответствии с ареалогией и окраской яиц, отнесенных к *An. martinius* (Marinucci et al., 1999). М.И. Гордеев с коллегами (2004) по результатам анализа ITS2 в популяциях этого региона описали новый вид – *An. artemievi*. Установлено, что *An. artemievi* обитает в северном Таджикистане (Habirov et al., 2012), где ранее находили *An. martinius*. О находках *An. martinius* в Таджикистане в работах последних лет сообщений нет. Последовательности ITS2 *An. martinius* [EMBL: AJ224329 и AY238406] и *An. artemievi* [EMBL: AJ849886] очень сходны (различия по четырем позициям, из которых две – моонуклеотидные делеции). Авторы, описавшие *An. artemievi*, представили последовательность ITS2

An. martinius [EMBL: AJ849885], резко отличающуюся от последовательности ITS2 *An. artemievi*. Учитывая все обстоятельства, можно заключить, что М. Marinucci с коллегами (1999) исследовали ITS2 существующего в тех местах вида *An. artemievi*, но ошибочно отнесли его к *An. martinius*.

Таким образом, к настоящему времени выявлено 11 палеоарктических видов комплекса *maculipennis*: *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, *An. melanoon* (syn. *subalpinus*), *An. persiensis*, *An. artemievi*, *An. sacharovi*, *An. martinius*, *An. messeae* А (*An. daciae*), *An. messeae* В и *An. beklemishevi*.

P.D. Hebert с коллегами (2003) предложили метод описания видов по последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы (COI), основанный на допущении равномерного накопления замен нуклеотидов в процессе дивергенции вариантов мтДНК. Критерием видовой самостоятельности авторы приняли дивергенцию COI в 2 %, что, по их расчетам, может произойти за 1 млн лет. Эта точка зрения не нашла подтверждения в ряде работ (Thelwell et al., 2000; Ваулин, Новиков, 2012; Храброва и др., 2013). В частности, последовательности COI близкородственных видов *An. messeae* А и *An. messeae* В образуют единый кластер. Генетическое расстояние между наиболее различающимися вариантами COI в пределах *An. messeae* s.l. сопоставимо с таковым между ним и *An. beklemishevi* (Ваулин, Новиков, 2012). Таксон *An. quadrimaculatus* был давно поделен на пять криптических видов (А, В, С, D и Е) (Cornel et al., 1996), однако вся эта группа была идентифицирована как один вид при изучении последовательностей COI (Cywinska et al., 2006). Следовательно, использование этой последовательности требует подкрепления другими данными для подтверждения межвидовой дифференциации. Афротропические виды *An. gambiae* и *An. arabiensis* (комплекс *Anopheles gambiae*) имеют перекрывающиеся полиморфизмы по мтДНК, но эти виды четко отличаются на уровне картины дисков политенных хромосом (Besansky et al., 1994).

Важным отличием генов рРНК от митохондриального гена COI является их согласованная эволюция (Dover, Flavell, 1984; Ganley, Kobayashi, 2007). В результате этого процесса может наблюдаться идентичность последовательностей генов рРНК и спейсеров или же стабильный (сходный у всех представителей вида) внутригеномный полиморфизм. По этой причине фрагменты генов рРНК, и в первую очередь ITS2, широко применяются для установления филогенетических связей и типирования видов *Anopheles* (Collins, Paskewitz, 1996; Beebe et al., 1999, 2001; Marinucci et al., 1999; Fanello et al., 2002; Wilkerson et al., 2004; Jariyapan et al., 2005; Ваулин, Новиков, 2012).

Особенностью дендрограмм, построенных на основе ITS2 палеоарктических видов комплекса *maculipennis*, является существенное различие их топологий, часто противоречащих результатам цитогенетического и гибридологического анализа (Marinucci et al., 1999; Гордеев и др., 2004; Новиков и др., 2004; Djadid et al., 2007). В частности, *An. atroparvus* может кластеризоваться с *An. messeae*, но не с гомосеквентным видом *An. labranchiae* (Kampen, 2005). *An. atroparvus* и *An. labranchiae* могут оказаться наиболее удаленными от неоарктических видов

(Djadid et al., 2007), несмотря на то что сколько-нибудь результативное скрещивание *An. freeborni* осуществлено только с этими двумя видами (Kitzmiller et al., 1967). Относительно высокое сходство отмечено между дендрограммами, построенными М. Marinucci с коллегами (1999) и Ю.М. Новиковым с коллегами (2004). Обе они в существенной степени соответствуют представлениям о филогении комплекса, сложившимся ранее.

Три филогенетических построения были сделаны с использованием последовательности ITS2 *An. beklemishevi*. В первой работе (Новиков и др., 2004) этот вид кластеризовался с *freeborni/hermsi/occidentalis*, во второй (Гордеев и др., 2004) – так же, как и в обзоре R.E. Harbach (2004), – с *An. quadrimaculatus*, в третьей (Kampen, 2005) – или с *freeborni/hermsi/occidentalis* или с остальными палеоарктическими видами. В первой и во второй работах была использована последовательность [EMBL: AJ511876] с многочисленными нестрогими прочитанными нуклеотидными позициями. Это обстоятельство и обилие инсерций/делеций в ITS2, обуславливающее многообразие вариантов выравнивания сравниваемых последовательностей ITS2 разных видов, могли оказать влияние на топологию ветвления.

Поиск консенсуса

В нашей работе проведены филогенетические исследования по последовательностям ITS2, COI, варибельного участка D2 28S рДНК и митохондриального гена 16S рРНК, результаты которых вынесены в Доп. материалы 1–3 и которые также были вовлечены в сравнительный анализ и использованы при построении консенсусной схемы филогенетических связей между видами.

Сравнительный анализ различных подходов позволяет заключить, что наибольшую ценность для филогенетических реконструкций рассматриваемой группы видов имеют результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований. Гибридологические исследования менее значимы, так как выполнены не в полном объеме, а результаты трудно интерпретировать из-за сложности связей между экологией, степенью репродуктивной изоляции и генетической дифференциации видов. Совокупность данных об отличии видов по полигенным хромосомам и молекулярным маркерам позволяет уверенно говорить о наличии внутри палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* трех пар близкородственных видов: *An. atroparvus/An. labranchiae*, *An. maculipennis/An. melanoon* и *An. messeae A/An. messeae B*. *Anopheles artemievi* гомосеквентен с *An. maculipennis*, но не образует с ним и с *An. melanoon* кластера на дендрограммах, построенных по ITS2. *Anopheles sacharovi* и *An. martinius* также близки и незначительно различаются по полигенным хромосомам.

Принимая во внимание отсутствие соответствия между рассмотренными схемами филогенетических связей палеоарктических видов *maculipennis*, мы выдвигаем две эволюционные гипотезы. Одна из них в основном опирается на молекулярно-генетические, вторая – на цитогенетические, экологические и ареалогические исследования.

В соответствии с результатами цитогенетического и гибридологического анализов кластер *An. maculipennis/*

An. melanoon занимает промежуточное положение между парами видов *An. atroparvus/An. labranchiae* и *An. messeae A/An. messeae B*. М. Marinucci с коллегами (1999) установили, что кластер *An. maculipennis/An. melanoon* по ITS2 близок к *An. messeae*, а результаты нашего исследования последовательности фрагмента гена 16S рРНК свидетельствуют о его близости к *An. atroparvus*. Если анализировать структуру ITS2 и не учитывать *An. beklemishevi*, то *An. sacharovi/An. martinius* – наиболее древняя ветвь группы (Marinucci et al., 1999; Новиков и др., 2004), однако, по результатам цитогенетического анализа, *An. sacharovi* произошел от *An. atroparvus*, а *An. martinius* – от *An. sacharovi* (White, 1978; Стегний, 1991). Генетические расстояния (Kimura, 1980), рассчитанные для последовательности фрагмента гена COI *An. sacharovi*, *An. messeae* s.l., *An. labranchiae* и *An. maculipennis*, показали наибольшую удаленность *An. sacharovi* от рассматриваемых видов: между самыми распространенными вариантами фрагмента гена COI *An. messeae* s.l., *An. labranchiae* и *An. maculipennis* они имели значения в пределах 0,027–0,034, а между этими видами и *An. sacharovi* – 0,054–0,057.

Топология дендрограмм, построенных на основе последовательностей COI палеоарктических видов без учета *An. beklemishevi*, может варьировать в случае применения разных алгоритмов и включения/исключения видов из анализа, и, как вариант, наиболее ранняя дивергенция *An. sacharovi* от предковой палеоарктической формы возможна. Ранняя дивергенция *An. sacharovi* не противоречит результатам анализа изоферментов (Bianchi et al., 1980). Можно допустить, что кластер *An. sacharovi/An. martinius* обособился ранее кластера *An. atroparvus/An. labranchiae* и обрел значительные особенности при независимой эволюции. Отметим, что *An. artemievi* и *An. persiensis* относительно близки к кластеру *An. sacharovi/An. martinius* по экологии и географическому распространению. Все четыре вида приспособлены к климату восточного Средиземноморья и Средней Азии. *Anopheles artemievi* гомосеквентен с *An. maculipennis*, но сходен с *An. sacharovi* и *An. martinius* по морфологии яиц (Гордеев и др., 2004).

Учитывая экологические особенности видов и последовательности ITS2, можно обоснованно полагать, что этапы адаптивной радиации анцестральной формы были следующими: кластер *An. sacharovi/An. martinius* отделился раньше других, *An. persiensis* был вторым, *An. artemievi* – третьим. Все другие палеоарктические виды, за исключением *An. beklemishevi*, дивергировали от предка, общего с *An. artemievi*, позже. На основании приведенных выше результатов и соображений в попытке найти консенсус построена обобщенная схема филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* (рисунок, а и Доп. материалы 2 (рис. 5), где дано обоснование приведенной кластеризации видов). В пользу того, что именно *An. beklemishevi* первым дивергировал от предковой формы палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*, свидетельствуют результаты анализа 16S рДНК, гена COI и варибельного участка D2 28S рДНК. Однако по структуре полигенных хромосом *An. beklemishevi* значительно отличается от «стандартной» для палеоарктических видов картины дисков (Стегний, 1991).

Объяснением этого противоречия отчасти может быть отбор, направленный в данном случае в сторону увеличения сходства нуклеотидных последовательностей (Новиков и др., 2004).

Можно взглянуть на филогению группы и с другой точки зрения. В качестве критерия филогенетической близости нередко применяют степень репродуктивной изоляции между видами, которая зависит от физиологических, экологических и поведенческих особенностей вида. Эти свойства генетически детерминированы сегментами генома, имеющими адаптивное выражение, а не нейтральными, используемыми в молекулярно-генетических исследованиях в качестве маркеров. Причем степени генетических отличий по каждому из указанных свойств вида могут быть совершенно несоизмеримыми. По этой причине для выяснения направления видообразования необходимо исследовать названные особенности видов и степень генетических различий между видами дифференциально.

На наш взгляд, в случае если географическое распространение видов хорошо известно, его закономерности также могут быть серьезным аргументом в установлении истории группы. Наиболее вероятно, что палеоарктическая ветвь комплекса *maculipennis* имеет североамериканское происхождение, а ее миграция в Евразию происходила через Берингийский мост. Относительно отдаленное родство *An. beklemishevi* с остальными палеоарктическими видами позволяет предполагать, что было две волны такой миграции. Предок всей палеоарктической группы, кроме *An. beklemishevi*, мигрировал в первой волне, а предок *An. beklemishevi* или собственно этот вид – во второй.

Географическое распространение видов палеоарктической ветви меняется закономерно. Ареалы видов комплекса – наибольшие на северо-востоке и севере Евразии и последовательно уменьшаются в юго-западном и южном направлении. Широко распространенные виды генетически более вариабельны и экологически менее специализированы, чем виды, обладающие небольшими ареалами. Виды с большими ареалами, скорее всего, являются предковыми для видов с малыми ареалами, но не наоборот (Lewontin, 1974). Основной фактор, влияющий на продолжительность жизненного цикла комаров, – температура окружающей среды, а она существенно возрастает в направлении с северо-востока на юго-запад Евразии. Следовательно, биологический возраст видов (число поколений и, соответственно, репликаций ДНК) в разных регионах Евразии не имеет прямого соответствия астрономическому времени. Например, *An. messeae* В имеет одну-две генерации в год в Восточной Сибири, а *An. sacharovi* имеет пять-семь генераций за год в Малой Азии. По этой причине *An. sacharovi* может эволюционировать примерно в пять раз быстрее. Следовательно, при учете нейтральных нуклеотидных замен, число которых в основном зависит от числа актов репликации и рекомбинации, самый молодой в астрономическом исчислении вид может оказаться биологически довольно старым и наиболее удаленным генетически, если он обитает в регионах с большой продолжительностью сезонов размножения. В целях проверки этого утверждения для

последовательности фрагмента гена COI нами была дополнительно построена методом UPGMA дендрограмма (Доп. материалы 2 (рис. 4)). Метод UPGMA основан на гипотезе молекулярных часов (Бейр, 1995). В соответствии с дендрограммой, *An. sacharovi* отделился от предковой формы раньше, чем неарктический *An. earlei*. Отклонение от принципа молекулярных часов влияет на топологию дендрограмм, построенных методом максимальной экономии. Последствия такого отклонения для других методов конструирования дендрограмм не ясны (Лукашов, 2009).

Филогенетические схемы, в которых кластеры *An. atroparvus*/*An. labranchiae* или *An. sacharovi* помещены в основание палеоарктической ветви, вызывают вопрос, какие причины заставили предковый палеоарктический вид переместиться на 5–7 тыс. км с северо-востока Евразии на юго-запад, чтобы начать адаптивную радиацию в Предкавказье или Центральной Европе, и почему исчез этот вид? Маловероятно, что *An. sacharovi* мог возникнуть в Сибири (т. е. на середине миграционного пути предковой формы), а затем переместиться на юго-запад через огромные пространства, в дальнейшем занятые произошедшими от него видами. Это противоречит идее о физиологической константности видов, обусловленной возникновением дискретных различий в теплоустойчивости клеток при видообразовании (Ушаков, 1957), а также феномену дискретности экологических ниш.

Опираясь на географическое распространение всех палеоарктических видов комплекса *maculipennis* (исключая *An. beklemishevi*), сходство политенных хромосом и высказанные выше соображения, мы выдвигаем вторую гипотезу об истории этой группы. Согласно ей, форма, мигрировавшая из Северной Америки в Евразию по Берингийскому мосту, по экологическим потребностям была близка *An. messeae* В или тождественна ему, т. е. холодоустойчива и экзотильна (Новиков, 1997). Предковый вид, встретив в Евразии подходящие условия, начал расширять свой ареал на ее обширные территории. Первым от этой древней формы произошел *An. maculipennis*. Вероятнее всего, это случилось в Европе, и видообразование сопровождалось перестройкой половой хромосомы – *An. messeae* В и *An. maculipennis* могут иметь идентичную структуру политенных аутосом (с учетом обширного хромосомного полиморфизма у *An. messeae* s.l.). *Anopheles messeae* А, вероятно, также произошел от *An. messeae* В, но позже *An. maculipennis*, распространился в Европе и начал экспансию на восток, усилившуюся с потеплением климата (Новиков, 1997; Novikov, Vaulin, 2014). Для более южных форм комплекса скорость накопления нуклеотидных замен за астрономическое время возросла вследствие увеличения числа поколений в год. *Anopheles maculipennis* дал начало *An. melanoon*, *An. artemievi*, вероятно, и *An. persiensis*. Однако, если три первых вида гомосеквентны, то *An. persiensis* цитогенетически не исследован. Вероятно, *An. atroparvus* произошел тоже от *An. maculipennis*, эти два вида различаются одной фиксированной инверсией в хромосомном плече 3R (Стегний, 1991). *Anopheles atroparvus* дал начало *An. labranchiae* и *An. sacharovi*, от последнего из которых произошел *An. martinius*. *Anopheles beklemishevi* дивер-

гировал от *An. earlei* или близкого ему вида в Америке и мигрировал в Евразию позже. Таким образом, филогения группы могла быть такой, как показано на рисунке, б.

В соответствии с нашей гипотезой, общее направление эволюции палеоарктической ветви комплекса было от экзотических, эвритермных форм, приспособленных к короткому лету и дикой природе, к эндофильным, адаптированным к длинному теплому сезону и ассоциированным с поселениями человека. Эврибионтные слабо специализированные виды дали начало стенобионтным и более специализированным. Адаптивная радиация группы завершилась в Южной Европе, Северной Африке, Средней Азии и Иране вследствие исчерпания потенциала физиологической толерантности к температуре.

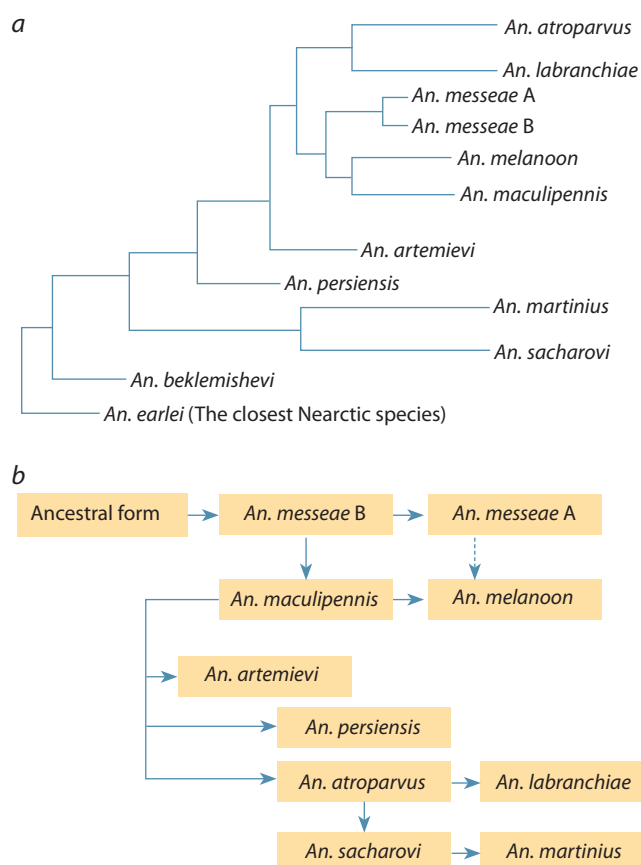
Особенность этой схемы – ее «инвертированность» по отношению ко многим другим, построенным ранее. Эта инвертированность объясняется различиями в темпах молекулярной эволюции различных палеоарктических членов комплекса *maculipennis*, а также сложностью эволюции физиологических и поведенческих черт.

Заключение

Предложенные нами схемы филогенеза палеоарктической ветви комплекса *maculipennis* – результат критического анализа известных представлений об ее эволюции, учета последних молекулярно-генетических исследований, а также закономерностей географического распространения и экологических особенностей видов этой группы.

Отсутствие цитогенетических и экологических данных для *An. persiensis* наряду с противоречиями топологий дендрограмм, построенных по результатам молекулярно-генетических исследований, требует дальнейшей работы. Учет несоразмерности астрономического и биологического времени при интерпретации эволюционного процесса в некоторой степени способствует решению этой проблемы.

Рассмотренные нами молекулярно-генетические филогенетические деревья основаны на малом числе маркеров. Более обширные исследования геномов могут значительно расширить представления об эволюции рассматриваемой группы видов. Возможным подходом в исследовании направления эволюции палеоарктической ветви комплекса является секвенирование участков, фланкирующих предположительно древние инверсионные варианты, и сравнение их с соответствующими участками генома неоарктических видов. Такая работа была проведена для хорошо изученного комплекса *Anopheles gambiae* (Kamali et al., 2012). Показано, что цитогенетическое сходство или различие видов могут быть обусловлены предковыми полиморфизмами и межвидовой гибридизацией (Fontaine et al., 2015). Если подобное будет установлено для палеоарктической ветви комплекса *maculipennis*, гомосеквентность *An. artemievi* и *An. maculipennis*/*An. melanoon* и его удаленность от этого кластера по другим признакам (см. Доп. материалы 2 (подпись к рис. 5)) могут быть объяснены. Однако наиболее перспективным подходом к установлению филогенетических связей между палеоарктическими видами комплекса *maculipennis* следует признать полногеномное исследование представителей разных популяций всех видов группы, а также наиболее близких североамериканских видов. Вместе с тем для



Consensus trees of the Palaearctic branch of the *maculipennis* complex. (a) The tree constructed with emphasis on molecular genetic data; (b) the tree constructed with emphasis on cytogenetics, ecology, and species ranges. The dotted arrow indicates a possible and less probable speciation direction.

установления направления видообразования необходимо учитывать все имеющиеся знания о видах комплекса *maculipennis*.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altuchov Yu.P. Populyatsionnaya genetika ryb [Population genetics of fish]. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1974. (in Russian)
- Beebe N.W., Ellis J.T., Cooper R.D., Saul A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* 1999;8(3):381-390.
- Beebe N.W., Maung J., van den Hurk A.F., Ellis J.T., Cooper R.D. Ribosomal DNA spacer genotypes of the *Anopheles bancroftii* group (Diptera: Culicidae) from Australia and New Guinea. *Insect Mol. Biol.* 2001;10(5):407-414.
- Besansky N.J., Powello J.R., Caccone A., Hamm D.M., Scott J.A., Collins F.H. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex

- suggests genetic introgression between principal malaria vectors. Proc. Natl Acad. Sci. 1994;91:6885-6888.
- Bianchi Bullini A.P., Cianchi R., Sabatini A., Coluzzi M., Bullini L. Ricerche elettroforetiche su specie paleartiche del complesso *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae). Atti XII Congr. Naz. Ital. Entomol. Roma. 1980;2:255-259.
- Carson H.L. The genetics of speciation at the diploid level. Am. Nat. 1975;109:83-92.
- Collins F.H., Paskewitz S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol. Biol. 1996;5(1):1-9.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., Di Deco M.A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1979;73(5):483-497.
- Cornel A.J., Porter C.H., Collins F.H. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. J. Med. Entomol. 1996;33(1):109-116.
- Cywinska A., Hunter F.F., Hebert P.D.N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med. Vet. Entomol. 2006;20:413-424.
- Di Luca M., Boccolini D., Marinucci M., Romi R. Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*An. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis. J. Med. Entomol. 2004;41(4):582-586. DOI <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.582>.
- Djadjid N.D., Gholizadeh S., Tafsiri E., Romi R., Gordeev M., Zakeri S. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. Malar. J. 2007;6:6.
- Dobzhansky Th. Genetics of the Evolutionary Process. New York: Columbia Univ. Press, 1970.
- Dover G., Flavell R. Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. Cell. 1984;38(3):622-623.
- Falleroni D. Fauna anofelica italiana e suo 'habitat' (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria. Riv. Malar. 1926;5(5-6):553-593.
- Fanello C., Santolamazza F., della Torre A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. Med. Vet. Entomol. 2002;16:461-464.
- Fontaine M.C., Pease J.B., Steele A., Waterhouse R.M., Neafsey D.E., Sharakhov I.V., Jiang X., Hall A.B., Catteruccia F., Kakani E., Mitchell S.N., Wu Y.C., Smith H.A., Love R.R., Lawnczak M.K., Slotman M.A., Emrich S.J., Hahn M.W., Besansky N.J. Mosquito genomics. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. Science. 2015;347(6217). DOI 10.1126/science.1258524.
- Ganley A.R.D., Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res. 2007;17:184-191.
- Gentile G., Santolamazza F., Fanello C.V., Petrarca V., Caccone A., della Torre A. Variation in an intron sequence of the voltage-gated sodium channel gene correlates with genetic differentiation between *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. Insect Mol. Biol. 2004;13(4):371-377.
- Gordeev M.I., Goryacheva I.I., Zvantsov A.B., Shaikovich E.V., Ezhov M.N. Molecular genetic analysis of malaria mosquito of Middle Asia. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Prilozhenie = Bulletin TSU, Supplement. Tomsk, 2004;10:17-19. (in Russian)
- Habirov Z., Kadamov D., Iskandarov F., Komilova S., Cook S., McAlister E., Harbach R.E. Malaria and the *Anopheles* mosquitoes of Tajikistan. J. Vector Ecol. 2012;37(2):419-427.
- Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. B. Entomol. Res. 2004;94(6):537-553.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. P. Roy. Soc. B. 2003;270:313-321.
- Higgins D.G., Thompson J.D., Gibson T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. Method Enzymol. 1996;266:383-402.
- Ilyinskaya N.B. A case of somatic mosaicism for a heterozygous paracentric inversion in chromosome II of *Chromosome plumosus*. Tsitologiya = Cytology. 1977;19(1):45-49. (in Russian)
- Jariyapan N., Choochote W., Junkum A., Jitpakdi A., Komalamisra N., Bates P.A., Crampton J.M. Sequence analyses of three nuclear ribosomal loci and a mitochondrial locus in cytologically different forms of Thai *Anopheles aconitus* mosquitoes. Southeast Asian J. Trop. Med. 2005;36(5):1162-1173.
- Kamali M., Xia A., Tu Z., Sharakhov I.V. A new chromosomal phylogeny supports the repeated origin of vectorial capacity in malaria mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Complex. PLoS Pathog. 2012;8(10):e1002960. DOI 10.1371/journal.ppat.1002960.
- Kampen H. The ITS2 ribosomal DNA of *Anopheles beklemishevi* and further remarks on the phylogenetic relationships within the *Anopheles maculipennis* group of species (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 2005;97:118-128.
- Kasap H. Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990;42(2):111-117.
- Khrabrova N.V., Andreeva Yu.V., Vaulin O.V., Alekseeva S.S., Sibataev A.K. Variability of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene sequence in species of the genera *Aedes* and *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(1):114-122. (in Russian)
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 1980;16:111-120.
- Kitzmiller J.B., Frizzi G., Baker R.H. Evolution and speciation within the maculipennis complex of the genus *Anopheles*. Eds. J.W. Wright, R. Pal. Genetics of Insect Vectors of Disease. Amsterdam: Elsevier Publ. Co, 1967;151-210.
- Kovalenko L.V., Zakharenko L.P., Voloshina M.A., Karamysheva T.V., Rubtsov N.B., Zakharov I.K. Behavior of *hobo* and *P* transposons in *yellow2-717* unstable line of *Drosophila melanogaster* and its derivatives after crossing with a laboratory strain. Genetika = Genetics (Moscow). 2006;42(6):748-756. (in Russian)
- Laboudi M., Faraj C., Sadak A., Harrat Z., Boubidi S.C., Harbach R.E., El Aouad R., Linton Y.M. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the *Anopheles maculipennis* group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*. Acta Trop. 2011;118:6-13.
- Lanzaro G.C., Lee Y. Speciation in *Anopheles gambiae* – The distribution of genetic polymorphism and patterns of reproductive isolation among natural populations. Ed. S. Manguin. *Anopheles* mosquitoes – New Insights into Malaria Vectors. InTech. Publ. 2013:175-196.
- Lewontin R.C. The Genetic Basis of Evolutionary Change. New York: Columbia Univ. Press, 1974.
- Lukashov V.V. Molekulyarnaya evolyutsiya i filogeneticheskiy analiz [Molecular evolution and phylogenetic analysis]. Binom Publ., Moscow, 2009. (in Russian)
- Marinucci M., Romi R., Mancini M., Di Luca M., Severini C. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. Insect Mol. Biol. 1999;8(4):469-480.
- Marrelli M.T., Sallum M.A.M., Marinotti O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy – A critical review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2006;101(8):817-832.
- Nicolescu G., Linton Y.M., Vladimirescu A., Howard T.M., Harbach R.E. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence. B. Entomol. Res. 2004;94(6):525-535.
- Novikov Yu.M. *Anopheles messeae* Fall (Diptera, Culicidae): two species in *statu nascendi*. Makroevolyutsiya [Macroevolution]. Materialy I Vsesoyuznoy konferentsii po problemam evolyutsii [Proceedings of the 1st All-USSR conference on evolutionary problems]. Moscow, Nauka Publ., 1984:13-14. (in Russian)

- Novikov Yu.M. Effects of global warming: Directed dynamics of *Anopheles* species proportions and cytogenetic structure of the taxon *Anopheles messeae* Fall in Western Siberia. Problemy evolyutsionnoy tsitogenetiki, selektsii i introduksii [Problems of evolutionary cytogenetics, breeding, and introduction]. Materialy nauchnykh chteniy, posvyashchennykh 100-letiyu professora A.P. Chekhova [Materials of scientific readings dedicated to the 100th anniversary of Professor A.P. Chekhov]. Tomsk, IAP TPU Publ., 1997:39-41. (in Russian)
- Novikov Yu.M., Shevchenko A.I. Inversion polymorphism and the divergence of two cryptic forms of *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) at the level of genomic DNA repeats. Genetika = Genetics (Moscow). 2001;37(7):915-925. (in Russian)
- Novikov Yu.M., Shevchenko A.I., Vaulin O.V. On the molecular-genetic divergence of cryptic species of the *Anopheles messeae* taxon (Diptera: Culicidae) and the phylogeny of the maculipennis complex. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Prilozhenie = Bulletin TSU, Supplement. Tomsk, 2004;(10):69-77. (in Russian)
- Novikov Yu.M., Vaulin O.V. Expansion of *Anopheles maculipennis* s.s. (Diptera: Culicidae) to northeastern Europe and northwestern Asia: Causes and Consequences. Parasites & Vectors. 2014;7:389. DOI 10.1186/1756-3305-7-389.
- Phillips A., Sabatini A., Milligan P.J.M., Boccolini D., Broomfield G., Molyneux D.H. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae): comparison of the cuticular hydrocarbon profiles determined in adults of five Palaearctic species. Bull. Entomol. Res. 1990;80:459-464.
- Porter C.H., Collins F.H. Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. Mol. Phylogenet. Evol. 1996;6(2):178-188.
- Ramsdale C., Snow K. Distribution of genus *Anopheles* in Europe. JEMCA (EMB). 2000;7:1-26.
- Sedaghat M.M., Linton Y.M., Oshagi M.A., Vatandoost H., Harbach R.E. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. Bull. Entomol. Res. 2003;93(6):527-535.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol. Syst. Biol. 2011;7:539.
- Stegnii V.N. Detection of chromosomal races of the malaria mosquito *Anopheles sacharovi*. Tsitologiya = Cytology. 1976;18(8):1039-1041. (in Russian)
- Stegnii V.N. Populyatsionnaya genetika i evolyutsiya malyariynykh komarov [Population genetics and evolution of malaria mosquitoes]. Tomsk, TSU Publ., 1991. (in Russian)
- Stegnii V.N., Kabanova V.M. Cytoecological study of the natural malaria mosquito population in the USSR: I. Isolation of a new species in the maculipennis complex of malaria mosquitoes by cytodagnosis. Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Diseases. 1976;14(2):192-198. (in Russian)
- Stegnii V.N., Sichinava Sh.G., Sipovich N.G. Test cross analysis and biology of malaria mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera, Culicidae) in Western Georgia. Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal (Moscow). 1984;63(4):613-619. (in Russian)
- Takken W., Geene R., Adam W., Jetten T.H., van der Velden J.A. Distribution and dynamics of larval populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the delta of the rivers Rhine and Meuse, The Netherlands. AMBIO. 2002;31(3):212-218.
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol. Biol. Evol. 1992;9:678-687.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011;28(10):2731-2739.
- Thelwell N.J., Huisman R.A., Harbach R.E., Butlin R.K. Evidence for mitochondrial introgression between *Anopheles bwambiae* and *Anopheles gambiae*. Insect Mol. Biol. 2000;9(2):203-210.
- Ushakov B.P. On labile and stable features of a species. Vestnik Leningradskogo gosudarstvennogo universiteta im. A.S. Pushkina = Vestnik of Pushkin Leningrad State University. 1957;4:153-154. (in Russian)
- Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Geographical variability of ITS2 rDNA and COI mtDNA and cryptic species of mosquito *Anopheles messeae* Fall. (Diptera: Culicidae). Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders. 2010;14(3):546-557. (in Russian)
- Vaulin O.V., Novikov Yu.M. Polymorphism and interspecific variability of cytochrome oxidase subunit I (COI) gene nucleotide sequence in sibling species of A and B An. messeae and An. beklemishevi (Diptera: Culicidae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012;16(2):358-368. (in Russian)
- Weir B.S. Analiz geneticheskikh dannykh [Genetic Data Analysis]. Moscow, Mir Publ., 1995. (in Russian)
- White G.B. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. Mosq. Syst. 1978;10(1):13-44.
- Wilkerson R.C., Reinert J.F., Li C. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiation six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 2004;41(3):392-401.
- Zulueta J. de, Ramsdale C., Cianchi R., Bullini L., Coluzzi M. Observations on the taxonomic status of *Anopheles sicauti*. Parassitologia. 1983;25(1):73-92.

Влияние половых хемосигналов самок на мукозальный иммунитет легких у самцов мышей линий BALB/c и C57BL/6

Г.В. Концевая, Е.А. Литвинова, М.П. Мошкин 

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

Реакция организма на иммуногенные стимулы во многом зависит от факторов, влияющих на тип развития иммунного ответа, таких как путь попадания в организм, цитокиновый фон, иммунный статус. Ранее было показано, что при попадании в верхние дыхательные пути самцов хемосигнальных молекул самок мышей в первую очередь происходит активация мукозального иммунитета, приводящая к повышению сопротивляемости животных респираторным инфекциям, что имеет важное приспособительное значение. Но активация мукозального иммунитета зависит от генетических особенностей иммунного реагирования. Мыши линий BALB/c и C57BL/6 характеризуются преобладанием гуморального (Th2) и клеточного (Th1) типов иммунного ответа соответственно и являются хорошей моделью для определения механизма активации мукозального иммунитета в ответ на хемосигналы самок. В опытах на самцах мышей линий BALB/c и C57BL/6 исследовали реакцию мукозального иммунитета респираторной системы на интраназальную аппликацию липополисахарида (ЛПС), раствора мочевины, физиологического раствора и мочи самок, используемой в качестве полового хемосигнала. Моча самок и ЛПС вызывали повышение количества лейкоцитов и концентрации белка в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) мышей линии BALB/c, но не линии C57BL/6, что свидетельствует о решающей роли иммунного ответа Th2-типа в активации мукозального иммунитета легких. При одинаковом влиянии на мукозальный иммунитет аппликация мочи самок вызывала существенно меньший подъем концентрации кортикостерона в плазме крови по сравнению с ЛПС. Таким образом, сигнальные механизмы защиты от инфекционных рисков, связанных с размножением, обеспечивают генотип-зависимую мобилизацию неспецифического иммунитета без существенной активации физиологических механизмов стресса.

Ключевые слова: половые хемосигналы самок; мукозальный иммунитет легких; преобладание иммунного ответа Th1- или Th2-типов; BALB/c; C57BL/6.

Effects of female sexual chemosignals on mucosal immunity in BALB/c and C57BL/6 male mice

G.V. Kontsevaya, E.A. Litvinova, M.P. Moshkin 

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The immune response to immunogenic stimuli depends on various factors like cytokine context, way of entry, and immune status of the organism. In mice, female chemosignal entry into the male organism via the respiratory system causes activation of the mucosal immune response, which leads to the development of enhanced resistance to infections and is of adaptive value. However, the activation of mucosal immunity depends on the genetic predispositions of the immune response. BALB/c and C57BL/6 are prototypically Th2- and Th1-type mouse strains, respectively, therefore, they can serve as perfect model organisms for studying mechanism of lung mucosal immune activation in response to female chemosignals. Respiratory tract mucosal immune response to intranasal application of LPS, urea solution, saline and female urine used as a chemosignal was investigated in BALB/c and C57BL/6 male mice. Application of both female urine and LPS increased total white blood cell count and protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid in BALB/c, but not in C57BL/6 male mice, suggesting an important role of Th2 pathway in lung mucosal immune response. At the same time, urine application provoked a significantly lower plasma corticosterone elevation than LPS. Thus, sexual signals associated with infection risks provide genotype-dependent mobilization of innate immunity without significant activation of physiological stress mechanisms.

Key words: female sexual chemosignals; lung mucosal immunity; Th1/Th2 immune balance; BALB/c; C57BL/6.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Концевая Г.В., Литвинова Е.А., Мошкин М.П. Влияние половых хемосигналов самок на мукозальный иммунитет легких у самцов мышей линий BALB/c и C57BL/6. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):704-707. DOI 10.18699/VJ15.123

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kontsevaya G.V., Litvinova E.A., Moshkin M.P. Effects of female sexual chemosignals on mucosal immunity in BALB/c and C57BL/6 male mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):704-707. DOI 10.18699/VJ15.123

ORIGINAL ARTICLE

Received 12.11.2015

Accepted for publication 14.12.2015

Online 20.12.2015

© AUTHORS, 2016

 e-mail: mmp@bionet.nsc.ru

Ранее было показано, что экспозиция самцов мышей запахом половозрелых самок приводит к миграции иммунокомпетентных клеток в бронхоальвеолярное пространство (Литвинова и др., 2009; Litvinova et al., 2009; Moshkin et al., 2013), в результате чего повышается устойчивость к заражению вирусом гриппа (Litvinova et al., 2010). Иными словами, хемосигналы к размножению, с которым связан риск респираторных инфекций при ольфакторном поиске партнера, усиливают мукозальный иммунитет дыхательных путей. Но адаптивная значимость такой реакции может быть разной при преобладании клеточного (Th1) или гуморального (Th2) типов иммунного ответа. Как известно, Т-лимфоциты мышей линии C57BL/6 секретируют в основном цитокины, характерные для Th1-иммунного ответа, а мышей линии BALB/c – для Th2-ответа (Mills et al., 2000). Мыши Th1-типа характеризуются более высокой бактерицидной активностью макрофагов по сравнению с мышами, у которых доминирует Th2-ответ (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004; Depke et al., 2014). При этом мыши линии C57BL/6 более устойчивы к некоторым респираторным инфекциям, чем мыши линии BALB/c (Paula et al., 2011; Shrivastava et al., 2015).

Неодинаковая восприимчивость линий C57BL/6 и BALB/c к респираторным инфекциям предполагает отличие в реакции этих генотипов на стимулы, мобилизующие мукозальный иммунитет. Действительно, интраназальная аппликация наночастиц двуокиси кремния вызывает более выраженную активацию мукозального иммунитета у мышей BALB/c, чем у C57BL/6 (Мошкин и др., 2011). Сравнительные исследования иммунных реакций у данных линий мышей представляют интерес не только для оценки вклада Th1- и Th2-реагирования в формирование защитных реакций, но и для выбора тест-объектов при экотоксикологических испытаниях.

Цель представленной работы – изучение межлинейных различий иммунного реагирования самцов линий C57BL/6 и BALB/c на половые хемосигналы самок, в качестве которых использовали обоснованный L.C. Drickamer (1984) метод интраназальной аппликации мочи.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на мышах инбредных линий C57BL/6 (20 самцов и 10 самок) и BALB/c (17 самцов и 10 самок). В возрасте 10 нед самцов и самок рассаживали в индивидуально вентилируемые клетки (OptiMice): самцов – по одному, а самок – по пять. Температуру поддерживали на уровне 24 ± 1 °C; влажность – 40–50 %; световой режим – 14 ч день/10 ч ночь; корм и вода – *ad libitum*. После двухнедельного индивидуального содержания самцы мышей каждой из линий были поделены на четыре группы по четыре–шесть особей, за исключением группы из двух самцов линии BALB/c, экспонированных раствором мочевины.

Через 15 мин после наркотизации этиламиналом натрия в дозе 40 мг/кг (внутрибрюшинное введение 200 мкл раствора) самцам первой группы интраназально апплицировали 25 мкл разведенной мочи самок, самцам из

второй группы – 25 мкл раствора ЛПС (*E. coli*, серотип 055:B5, Sigma, США, в дозе 50 мкг/кг); самцам третьей группы – 25 мкл раствора мочевины (Sigma, США) в концентрации 0,2 мг/мл, что соответствует концентрации мочевины в моче мышей, разведенной в пять раз. Самцам контрольной группы вводили 25 мкл физиологического раствора. Мочу для интраназального введения собирали от 10 половозрелых самок по 10–20 мкл в общую пробирку, тщательно перемешивали, замораживали и хранили при –20 °C. За день до начала эксперимента образцы мочи размораживали при комнатной температуре и разводили физиологическим раствором в пять раз.

Через 4 ч после введения препаратов животных умерщвляли методом краниоцервикальной дислокации и собирали образцы БАЛ, промывая легкие тремя порциями физиологического раствора объемом по 1 мл, через интравенозный катетер (KD Medical GmbH Hospital Products, Германия), введенный в трахею. Все три порции объединяли в одной центрифужной пробирке с градуированным объемом (TPP, Швейцария). Образцы БАЛ центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин при +4 °C для осаждения клеток. Супернатант отбирали и определяли в нем концентрацию белка по методу Бредфорда. Подсчет клеток проводили в 300 мкл образца БАЛ. Осадок встряхивали для равномерного распределения клеток. Общее количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева под микроскопом проходящего света Leica DM-1000 (Leica Microsystems, Германия) после окрашивания раствором Тюрка (Türk's solution, Merk, Германия). Количество клеток пересчитывали на 1 мл. Образцы крови брали из ретроорбитального синуса прижизненно через 4 ч после введения растворов, т. е. непосредственно перед краниоцервикальной дислокацией. Концентрацию кортикостерона определяли в плазме крови радиоиммунным методом, согласно протоколу к используемым антителам (Anti-Corticosterone, Sigma).

Данные количества лейкоцитов и концентрации белка в БАЛ, а также концентрации кортикостерона в плазме крови были предварительно логарифмированы, что позволило привести их вариационные ряды к нормальному распределению. Поэтому для выявления эффектов генотипа и введения препаратов на показатели количества лейкоцитов и концентрации белка в БАЛ и уровня кортикостерона в плазме крови использовали многофакторный дисперсионный анализ. При сравнении средних в двух группах животных по непараметрическому критерию Манна–Уитни использовали нелогарифмированные данные. Для множественного сравнения средних применяли LSD-тест.

Результаты и обсуждение

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что на общее количество лейкоцитов в БАЛ (рис. 1, а) оказывали влияние генотип ($F_{1,36} = 84,88, p < 0,001$), введение растворов ($F_{1,36} = 4,76, p = 0,008$) и взаимодействие этих факторов ($F_{1,36} = 5,54, p = 0,004$). Число лейкоцитов в БАЛ значимо повышалось в ответ на введение ЛПС и мочи самок по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор, только у самцов линии BALB/c. У самцов линии C57BL/6 их число не изменялось. Введение раство-

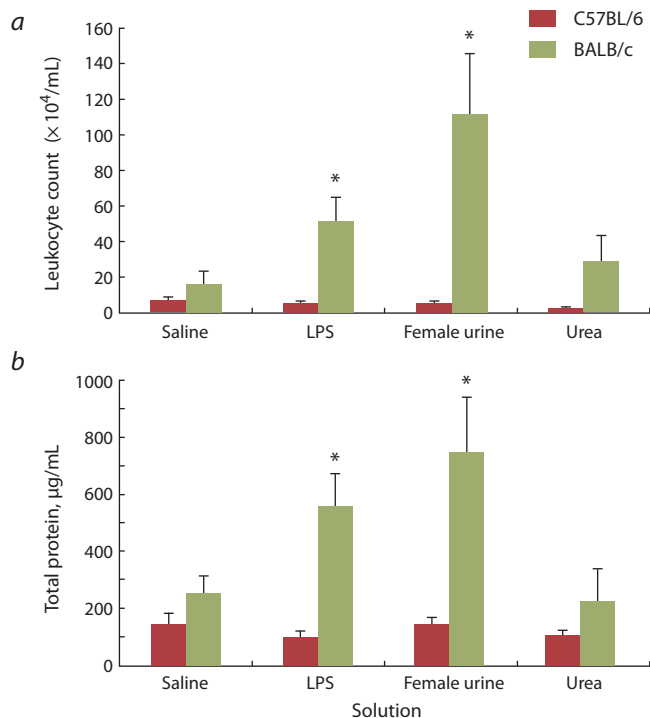


Fig. 1. Leukocyte count (a) and total protein concentration (b) in BAL from C57BL/6 (red columns) and BALB/c (green columns) male mice four hours after intranasal application of saline, LPS, female urine, or urea solution.

* $p < 0.05$ compared to control; Mann–Whitney U-test.

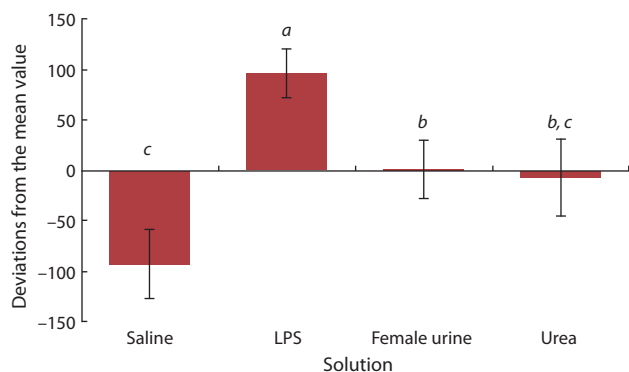


Fig. 2. Plasma corticosterone concentrations (residual dispersions) in male mice four hours after intranasal application of saline, LPS, female urine, or urea solution. Different letters above column show statistically significant differences of the means ($p < 0.05$; LSD test).

ра мочевины не влияло на количество лейкоцитов в БАЛ у мышей обеих линий.

Концентрация белка в БАЛ (рис. 1, б) также зависела от генотипа самцов мышей ($F_{1,36} = 39,34$, $p < 0,001$) и от введения растворов ($F_{1,36} = 3,23$, $p = 0,04$). Эффект взаимодействия факторов «генотип» и «введение растворов» был близким к статистически значимому ($F_{1,36} = 2,7$, $p = 0,06$).

Введение ЛПС и мочи самок вызывало повышение концентрации белка в БАЛ по сравнению с контролем только у самцов мышей линии BALB/c. У самцов линии C57BL/6 концентрация белка в БАЛ в ответ на эти стимулы не изменялась. Введение мочевины не влияло на уровень белка у мышей обеих линий.

Таким образом, интраназальная аппликация ЛПС вызывала увеличение числа лейкоцитов и концентрации белка в БАЛ только у самцов линии BALB/c, для которых характерно преобладание Th2-типа иммунного ответа, но не влияла на эти показатели у животных линии C57BL/6. Это можно объяснить тем, что Th2-цитокины индуцируют экспрессию селективных хемокинов, которые усиливают направленную миграцию лейкоцитов из кровотока в очаг воспаления, тогда как Th1-цитокины подавляют их продукцию (Bonocchi et al., 1998; Tellem et al., 2000). Межлинейные различия в реакции мукозального иммунитета дыхательных путей, установленные по отношению к ЛПС, были полностью воспроизведены при использовании в качестве иммуномодулирующего стимула половых хемосигналов. Причем величина лейкоцитарной и белковой реакции на аппликацию мочи была сопоставима с таковой в ответ на интраназальное введение бактериального эндотоксина.

Как следует из наших экспериментов, реакция мукозального иммунитета мышей линии BALB/c на аппликацию мочи не связана с раздражающим действием мочевины, введение которой не влияло на количество лейкоцитов и концентрацию белка в БАЛ. Это хорошо согласуется с полученными ранее результатами, из которых следует, что запах загрязненной подстилки из клеток с половозрелыми самками стимулирует у самцов мышей миграцию лейкоцитов в бронхоальвеолярное пространство даже при отсутствии прямого контакта с источником запаховых стимулов (Литвинова и др., 2009; Litvinova et al., 2009, 2010).

На концентрацию кортикостерона в плазме крови достоверное влияние оказывали генотип животных ($F_{1,37} = 4,26$, $p = 0,048$) и введение растворов ($F_{1,37} = 6,48$, $p = 0,002$). Взаимодействие этих факторов не было статистически значимым ($F_{1,37} = 0,78$, $p = 0,51$). Так как взаимодействие факторов не вносило существенного вклада в дисперсию анализируемого признака, то для оценки влияния растворов данные по обоим генотипам были объединены после их предварительного центрирования относительно средних значений для каждой линии мышей. Из анализа остаточных дисперсий видно, что введение ЛПС вызывало максимальный подъем концентрации кортикостерона в плазме крови (рис. 2). При интраназальной аппликации мочи и мочевины уровень глюкокортикоидов был ниже, чем при аппликации ЛПС.

Хорошо известно, что бактериальный эндотоксин активирует не только неспецифическую иммунную систему, но и механизмы стресс-реакции (Tonelli et al., 2008). Однако именно в этом компоненте реагирования выявлены существенные отличия ЛПС и запаховых стимулов. При одинаковом влиянии на мукозальный иммунитет аппликация мочи самок вызывала существенно меньший подъем концентрации кортикостерона в плазме крови по сравнению с ЛПС. Такой же подъем уровня глюкокортикоидов

был отмечен и при интраназальном введении раствора мочевины. При сопоставлении полученных данных с результатами экспериментов, в которых было исследовано дистантное действие запаха самок на иммунные и эндокринные характеристики самцов, можно заключить, что половые хемосигналы стимулируют миграцию лейкоцитов в бронхоальвеолярное пространство, а мочевина, попадающая в верхние дыхательные пути при аппликации мочи самок, в большей степени отвечает за наблюдаемую в этом случае умеренную стресс-реакцию.

Итак, хемосигналы самок, содержащиеся в моче, вызывают активацию механизмов мукозального иммунитета респираторной системы у самцов, но в отличие от эффектов ЛПС эта реакция сопровождается меньшим стрессорным эффектом. Выраженность запаховой иммуномодуляции зависит от генотипа животных, определяющего разный уровень восприимчивости к респираторным инфекциям. Активация мукозального иммунитета более выражена у мышей линии BALB/c, которые характеризуются генетически детерминированным преобладанием реакции Т-хелперов второго типа (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004). У мышей линии C57BL/6, которые конститутивно более устойчивы к респираторным инфекциям, мукозальная реакция на сигнальные иммуномодуляторы практически отсутствует. Полученные данные служат еще одним обоснованием необходимости учета генетических особенностей иммунного реагирования при исследовании реакций организма на иммуностимулирующие аэрозоли, включая наночастицы и разные виды аллергенов.

Acknowledgments

The experimental work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004. The statistical evaluation and discussion were supported by the Russian Science Foundation, project 14-14-00221.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Bonecchi R., Sozzani S., Stine J.T., Luini W., D'Amico G., Allavena P., Chantry D., Mantovani A. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood*. 1998;92(8):2668-2671.

Depke M., Breitbach K., Dinh Hoang Dang K., Brinkmann L., Salazar M.G., Dhople V.M., Bast A., Steil L., Schmidt F., Steinmetz I., Völker U. Bone marrow-derived macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice fundamentally differ in their respiratory chain complex proteins, lysosomal enzymes and components of antioxidant stress systems. *J. Proteomics*. 2014;103:72-86.

Drickamer L.C. Urinary chemosignals from mice (*Mus musculus*): Acceleration and delay of puberty in related and unrelated young females. *J. Compar. Psychol.* 1984;98(4):414-420.

Illem A., Colantonio L., Bhakta S., Sozzani S., Mantovani A., Sinigaglia F., D'Ambrosio D. Inhibition by IL-12 and IFN- α of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 2000;30(4):1030-1039.

Litvinova E.A., Garms A.I., Zaidman A.M., Korel A.V., Gerlinskaya L.A., Moshkin M.P. Re-distribution of immune defense in male mice exposed by female scent. *Zhurnal obshchey biologii = Journal of General Biology*. 2009;70(1):46-55. (in Russian)

Litvinova E.A., Goncharova E.P., Zaydman A.M., Zenkova M.A., Moshkin M.P. Female scent signals enhance the resistance of male mice to influenza. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9473. DOI 10.1371/journal.pone.0009473.

Litvinova E.A., Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Nagatomi R., Zhang X., Matsuo K., Shikano S. Female scent mobilizes leukocytes to airways in BALB/c male mice. *Integr. Zool.* 2009;4:285-293.

Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000;164(12):6166-6173.

Moshkin M.P., Kontsevaya G.V., Litvinova E.A., Gerlinskaya L.A. IL-1 β -independent activation of lung immunity in male mice by female odor. *Brain Behav. Immun.* 2013;30:150-155.

Moshkin M.P., Peltek S.E., Gerlinskaya L.A., Goryachkovskaya T.N., Kontsevaya G.V., Maslennikova S.O., Popik V.V., Kolchanov N.A. Acute immune response to the intranasal application of nanoparticles of SiO₂ (Tarkosil 25) in mice of two strains. *Rossiyskie nanotekhnologii = Russian Nanotechnology* 2011;6(9/10):47-54. (in Russian)

Paula M.O., Fonseca D.M., Wolk P.F., Gembre A.F., Fedatto P.F., Sérgio C.A., Silva C.L., Bonato V.L. Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol. Cell Biol.* 2011;89(4):526-534.

Shrivastava P., Watkiss E., van Drunen Littel-van den Hurk S. The response of aged mice to primary infection and re-infection with pneumonia virus of mice depends on their genetic background. *Immunobiology*. 2016;221(3):494-502.

Tonelli L.H., Holmes A., Postolache T.T. Intranasal immune challenge induces sex-dependent depressive-like behavior and cytokine expression in the brain. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(5):1038-1048.

Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22(5):460-466.

Ингибирование мутагенной активации орто-аминоазотолуола повышает его канцерогенность для печени мышей

В.И. Каледин¹, Л.П. Овчинникова¹, С.И. Ильницкая¹, Т.С. Морозкова², Н.А. Попова^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В злокачественных опухолях человека и животных часто обнаруживаются мутантные варианты генов, контролирующих размножение и рост клеток. В то же время многие канцерогены проявляют положительную активность в различных тестах на мутагенность. Это свидетельствует в пользу представлений о генотоксическом механизме канцерогенеза. Считается, что если химически активные канцерогены вызывают мутации при непосредственном взаимодействии с ДНК, то химически неактивные активируются до мутагенных продуктов в процессе метаболических превращений в организме. Было установлено, что аминоазокрасители активируются путем N-гидроксилирования и последующей конъюгации с остатком серной кислоты, катализируемой печеночной сульфотрансферазой, ферментом второй фазы метаболизма ксенобиотиков. Ранее мы показали, что именно активированные метаболиты орто-аминоазотолуола ответственны за ингибирование глюкокортикоидной индукции тирозинаминотрансферазы у чувствительных к его гепатоканцерогенному действию мышей. Подавление с помощью ингибитора сульфотрансферазы пентахлорфенола сульфатирования 4-аминоазобензола, другого канцерогенного для мышей азокрасителя, приводило, по литературным данным, к снижению его как мутагенной, так и канцерогенной активности. Мы подтвердили это наблюдение. Однако при использовании с орто-аминоазотолуолом пентахлорфенол так же, как в случае с 4-аминоазобензолом, подавлял его мутагенное действие, но значительно усиливал канцерогенное. Следовательно, канцерогенное действие на печень оказывает неметаболизированный орто-аминоазотолуол или его несulfатированные немутагенные метаболиты. О негенотоксическом механизме действия канцерогенов говорят и наши результаты параллельных опытов с орто-аминоазотолуолом и 3,4-бензпиреном, которые, одинаково активируясь ферментами печени мышей в мутагенном отношении, вызывают опухоли в разных тканях: первый – гепатоцеллюлярные в печени, а второй – лимфоидные в селезенке. Таким образом, принятые представления о генотоксическом механизме действия канцерогенов требуют пересмотра.

Ключевые слова: орто-аминоазотолуол; сульфоконъюгация; мутагенная активация; канцерогенность.

Inhibition of mutagenic activation of ortho-aminoazotoluene increases its carcinogenicity for mouse liver

V.I. Kaledin¹, L.P. Ovchinnikova¹, S.I. Il'nitskaya¹, T.S. Morozkova², N.A. Popova^{1,3}

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

² Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Various mutationally impaired genes are often found in malignant tumors of animals and humans. At the same time, a large number of carcinogens demonstrate positive activity in different in vitro tests for mutagenicity. These findings are indicative of a genotoxic mechanism of carcinogen action. It is considered that chemically active carcinogens induce mutations (and tumors) directly interacting with DNA, while inactive substances are mutagenically activated in the processes of cellular metabolism in target tissues. The aminoazo dyes were found to be activated by N-hydroxylation and subsequent conjugation with sulfuric acid catalyzed by the enzyme sulfotransferase. Previously we found that it is activated metabolites of ortho-aminoazotoluene that are responsible for its inhibitory effect on hormonal induction of tyrosine aminotransferase activity in the liver of sensitive mice. Inhibition of sulfoconjugation of 4-aminoazobenzene, another hepatocarcinogen for mice, by pentachlorophenol was reported to reduce its both mutagenic and carcinogenic activity. In this paper, we confirmed this observation. But we found that, when used ortho-aminoazotoluene, pentachlorophenol inhibited its mutagenic activity, but significantly stimulated the hepatocarcinogenic potency. It seems that carcinogenic action is provoked by unmetabolized ortho-aminoazotoluene per se or some of its non-sulfated derivatives. The results of our comparative study with ortho-aminoazotoluene and 3,4-benzopyrene are in contradiction with the genotoxic theory

of carcinogenesis: both are similarly activated by mouse liver enzymes, but induce tumors in different tissues: the former, hepatocellular carcinomas and the latter, splenic lymphoma. The conclusion was made that the accepted notion about the mechanism of carcinogenesis has to be revised.

Key words: ortho-aminoazotoluene; sulfoconjugation; mutagenic activation; carcinogenicity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Каледин В.И., Овчинникова Л.П., Ильницкая С.И., Морозкова Т.С., Попова Н.А. Ингибирование мутагенной активации орто-аминоазотолуола повышает его канцерогенность для печени мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):708-715. DOI 10.18699/VJ16.190

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kaledin V.I., Ovchinnikova L.P., Il'nitskaya S.I., Morozkova T.S., Popova N.A. Inhibition of mutagenic activation of ortho-aminoazotoluene increases its carcinogenicity for mouse liver. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):708-715. DOI 10.18699/VJ16.190

С помощью современных методов исследования в злокачественных опухолях человека и животных обнаруживаются мутантные варианты генов, контролирующих основные процессы жизнедеятельности клетки (размножение, рост, дифференцировку). Именно с накоплением таких мутаций обычно связывают возникновение и прогрессию опухолей. По мнению одних авторов, для развития опухоли необходимо накопление в клетке от трех до шести генетических повреждений (Абилов и др., 2012), по другим данным – до 10 (Зборовская, 2004). Поэтому считается, что «если вещество индуцирует опухоли, оно, следовательно, реагирует с ДНК, вызывая специфическую мутацию; если же оно не вызывает мутации, то не должно быть канцерогеном» (Турусов и др., 2004. С. 212). Если химически активные соединения (азотистый иприт, нитрозомочевина и др.) способны вызывать мутации при непосредственном взаимодействии с ДНК, то неактивные в химическом отношении полициклические углеводороды, аминозокрасители и т. п. приобретают такую способность после их метаболической активации в тканях-мишенях.

Для аминозокрасителей было установлено, что исходные соединения подвергаются в печени крыс С- и N-гидроксилированию, катализируемому NADPH-зависимой системой микросомальных монооксигеназ, и последующей конъюгации в реакциях второй фазы метаболизма ксенобиотиков. При этом если конъюгаты С-гидроксилированных производных неактивны в канцерогенном отношении и выводятся из организма, то при сульфоконъюгации N-гидроксипроизводных образуются высокореакционноспособные электрофильные соединения, способные атаковать нуклеофильные центры клеточных макромолекул, в том числе ДНК, и вызывать мутации (Миллер Дж., Миллер Э., 1955; Miller, 1970; Miller J.A., Miller E.C., 1969; Miller E.C., Miller J.A., 1981). Эти данные были с энтузиазмом встречены биохимиками и молекулярными биологами, увидевшими в них экспериментальное доказательство тогда еще умозрительных, но уже чрезвычайно популярных представлений о генотоксическом механизме действия канцерогенов. Поэтому как само собой разумеющееся было воспринято сообщение о том, что ингибирование пентахлорфенолом (ПХФ) сульфоконъюгации, последнего этапа метаболической активации 4-аминоазобензола (АБ), подавляет связывание его с ДНК

и снижает частоту индукции опухолей печени (Delclos et al., 1984, 1986). В опытах с 2-ацетиламинофлуореном (2-ААФ) также было обнаружено, что непосредственно активным канцерогеном для печени крыс является мутагенный сернокислый эфир его N-гидроксипроизводного (Weisburger et al., 1972). Это же было показано для эстрагола и сафрولا (Fennel et al., 1985).

С другой стороны, в литературе были многочисленные наблюдения, свидетельствующие о наличии определенного параллелизма между ингибирующим влиянием гепатоканцерогенов на глюкокортикоидную индукцию активности адаптивных ферментов печени и способностью индуцировать опухоли печени у этих животных (Каледин, Захарова, 1984; Каледин и др., 2015). Обнаружив в специальных экспериментах, что глюкокортикоидная индукция тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируется не исходным орто-аминоазотолуолом, а продуктами его метаболизма, мы должны были признать, что и канцерогенное действие этого соединения реализуется через его активированные метаболиты (Каледин и др., 1997). Не усомнились в этом мы и когда, анализируя литературные данные, обратили внимание на то, что Е. и Дж. Миллеры с коллегами (Delclos et al., 1984, 1986) на подсосных мышках использовали исключительно АБ и его моно- и диметильные производные, применяющиеся обычно в опытах на крысах, и не использовали 2'-3-диметил-АБ (по старой номенклатуре орто-аминоазотолуол, ОАТ), для которого к тому времени были известны высокие специфичность в отношении канцерогенного действия на печень мышей и мутагенность продуктов его активации ферментами печени в бактериальных тестах *in vitro* (Ames et al., 1973).

Расценивая это как некоторое упущение, мы изучили в тех же условиях – на подсосных мышках с использованием ПХФ – влияние ингибирования сульфоконъюгации на канцерогенное действие и ОАТ. Неожидаанные результаты, полученные в этих опытах, потребовали сопоставления их с результатами американских исследователей. Мы повторили эксперименты, взяв для сравнения используемый ими АБ. В настоящей работе показано, что если данные об ингибирующем влиянии ПХФ на канцерогенность АБ (Delclos et al., 1986) хорошо воспроизводятся, то в случае с ОАТ ПХФ оказывает противоположное влияние, а именно усиливает его канцерогенное действие на печень. В бактериальном тесте Эймса на мутагенность в

присутствии клеточных ферментов (S9-фракции) печени мышей как АБ, так и ОАТ вызывали образование мутантных колоний, а при наличии в активационной среде ПХФ их образовывалось значительно меньше. Стимуляция же *in vivo* активности ферментов, метаболизирующих аминоазокрасители, приводила к снижению у мышей выхода индуцированных ОАТ опухолей печени. Полученные результаты показывают, что для индукции опухолей печени у мышей ОАТ не нуждается в метаболической активации и, следовательно, канцерогенное действие химических соединений может осуществляться не через их мутагенные метаболиты.

Материалы и методы

В работе использованы АБ и ОАТ (ICN, США), 3,4-бензпирен (FERAK, ФРГ) ароклор 1254 (SUPELCO, США), фенобарбитал (FLUKA, Швейцария). Калий железосинеродистый и железо (II) сернокислое 7-водное получены из ЗАО «Союзхимпром». Все отечественные препараты и реактивы были квалификации «хч» и «чда». Животные – мыши линий ICR и CBA/LacSto (CBA), а также гибриды первого поколения между мышами CBA и C57BL/6 – получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН.

Мышей содержали группами по шесть–восемь особей в пластиковых ванночках площадью 20 × 36 см при контролируемой температуре и освещении, они получали гранулированный полнорационный корм «Чара» и воду *ad libitum*. Все манипуляции с ними проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European communities council directive (86/609 ЕЕС). Для получения подсосных мышат родительских животных содержали группами по три самки и одному самцу в клетке. Родившимся мышатам-самцам в 12–13-дневном возрасте вводили в брюшную полость масляные растворы АБ или ОАТ в объеме 0,01 мл на 1 г массы тела животных; при этом доза АБ составляла 50 мг/кг, а ОАТ – 225 мг/кг. В опытах с использованием пентахлорфенола его вводили в масляном растворе по 0,1 мл на 10 г массы тела мышат, что составляло примерно 14 мкг ПХФ на 1 г массы тела. В экспериментах с индукцией ферментов метаболизма ксенобиотиков мышатам в 10-дневном возрасте в брюшную полость ввели по 60 нг (10 мкг/кг) 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-диоксина (ТХДД), любезно предоставленного нам доктором В.В. Литваком (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Контрольным мышатам аналогично вводили растворитель (оливковое масло). Во всех случаях животные хорошо переносили инъекции, без каких-либо признаков токсического влияния. Через трое суток (в 13-дневном возрасте) всем животным ввели ОАТ, как описано выше. В месячном возрасте мышат отсаживали от родителей и до окончания эксперимента содержали группами по шесть–восемь особей в клетке в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище. В возрасте 10–12 мес им в течение четырех–пяти дней давали корм, содержащий 3 % сернокислого железа, после чего умерщвляли декапитацией, определяли абсолютную и относительную массу печени и после окрашивания по Перлсу (Williams et al., 1976; Kaledin et al., 2014b) под бинокулярной лупой определяли в ней количество и раз-

мер желездефицитных предопухолевых и опухолевых узелков. При этом учитывали как общее число узелков, так и количество условно предопухолевых и опухолевых узелков, считая предопухолевыми узелки диаметром до 1,5 мм и опухолевыми – от 2 мм и более, как это принято в подобных исследованиях (Каледин и др., 2005; Kaledin et al., 2014b). После подсчета узелков типичные образцы фиксировали в 10 % формалине, готовили гистологические срезы и исследовали под микроскопом.

Оценку мутагенной активности изучаемых соединений проводили в тесте Эймса на одном из тестерных гистидин-зависимых штаммов *Salmonella typhimurium* TA98, как описано ранее (Овчинникова и др., 2012; Frolova et al., 2015), с использованием для активации ферментов S-9 фракции печени мышей, интактных или индуцированных ароклором 1254 (250 мг/кг), фенобарбиталом (трижды по 80 мг/кг ежедневно) или ТХДД (10 мкг/кг однократно). Индукторы вводили в брюшную полость животных, через три–пять дней их умерщвляли декапитацией, печень перфузировали холодным 1,15 М KCl, 20 mM трис-HCl буфером, pH 7,4 и гомогенизировали в трех объемах этого буфера. Гомогенаты центрифугировали при 9000 g в течение 15 мин, супернатанты (S-9-фракцию) хранили в стерильных ампулах до использования при –70 °C. S-9-фракцию печени интактных мышей получали аналогично. Бактериальные клетки хранили в жидком азоте как замороженную культуру с добавлением 10 % диметилсульфоксида. Для экспериментов стоки бактерий высевали на чашки с глюкозным агаром, гистидином и ампициллином (так называемые «мастер»-чашки). Для постановки теста отдельную колонию с «мастер»-чашки инокулировали в 5 мл L-бульона с 50 мкг/мл ампициллина и инкубировали при 37 °C в течение 15–16 ч. Концентрация бактерий ночной культуры штамма TA 98 составляет примерно $1-2 \times 10^8$ клеток/мл. В тест-системе Эймса применяли метод двуслойного агара. Нижний слой состоял из 1,5 % агара на минимальной среде M9, содержащей 20 % глюкозы и 50 мг/мл ампициллина. Для верхнего слоя готовили 100 мл 0,7 % топ-агара в физиологическом растворе NaCl, в который добавляли 10 мл 0,5 mM раствора гистидин-биотина. Его разливали в пробирки по 2 мл, охлаждали до 45 °C и оставляли при этой температуре в водяной бане. При проведении тест-анализа в пробирки добавляли по 100 мкл ночной культуры бактерий и анализируемый мутаген (в контроле – растворитель) в подобранной ранее концентрации (10–20 мкг на чашку). Если тест-анализ проводили с метаболической активацией, то добавляли еще 0,5 мл активационной среды, содержащей К-фосфатный буфер (pH 7,4), MgCl₂, NADP, глюкозо-6-фосфат и S9-фракцию из печени интактных или индуцированных животных. Смесь быстро перемешивали и выливали на подготовленные чашки (по шесть чашек на точку), равномерно распределяя ее по поверхности нижнего слоя агара. Через 48 ч инкубации при 37 °C в верхнем слое агара в виде мелкой сеточки были видны колонии бактерий-ауксотрофов, выросшие на фоновой концентрации гистидина, а на их фоне – проросшие в нижний слой агара отдельные His⁺-колонии ревертантов по гистидиновому локусу. В качестве контроля использовали клетки бактерий TA98: а) не подвергшиеся

мутагенному воздействию (частота колоний составляла 30–50 на чашку) и б) подвергшиеся действию прямого мутагена 4-нитрохинолин-N-оксида, который в концентрации 0,25 мкг/мл давал 150–176 ревертантных колоний.

Полученные результаты обрабатывали статистически и достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента и arcsin-преобразования Фишера.

Результаты и обсуждение

Ингибирующее влияние ПХФ на гепатоканцерогенное действие АБ показано сотрудниками лаборатории Е. и Дж. Миллеров в нескольких сериях экспериментов на мышах линии CD-1 и гибридах первого поколения между мышами C3H/He и C57BL/6 (C3BF1) (Delclos et al., 1984, 1986). Мы подтвердили это наблюдение на мышах линии СВА (Каледин, Ильницкая, 2011). Влияние ПХФ на канцерогенное действие ОАТ было изучено только нами и также на мышах линии СВА (Каледин, Ильницкая, 2011). Поэтому для того чтобы выяснить, не обусловлен ли обнаруженный эффект собственной канцерогенностью ПХФ для мышей этой линии, т.е. не является ли он линейно-специфическим, мы провели серию специальных экспериментов на мышах разных генотипов, результаты которых суммированы в табл. 1. Из приведенных данных видно, что, не увеличивая частоту и множественность опухолей печени по сравнению со значениями этих показателей у интактных мышей данной линии (СВА), ПХФ на 1/4 снижал число опухолей, индуцированных у них АБ, и в 4–5 раз увеличивал число опухолей, индуцированных ОАТ; в 2,6–4,3 раза ПХФ увеличивал число индуцированных ОАТ опухолевых узелков в печени мышей других линий (табл. 2).

О том, что подавление ПХФ канцерогенного действия АБ реализуется через влияние на метаболизм этих соединений, свидетельствует отсутствие его влияния на канцерогенность диэтилнитрозамина, в метаболизме которого ПХФ не принимает участия (Miller et al., 1983). Чтобы удостовериться в том, что и усиление им канцерогенности ОАТ связано с ингибированием метаболической активации последнего, в следующих экспериментах мы использовали противоположное воздействие, а именно стимулировали активацию канцерогена. Применяющиеся обычно при работе на взрослых животных индукторы микросомальных монооксигеназ (Ароклор 1254, 20-метилхолантрен, 3,4-бензпирен) мало подходили для использования на подсосных мышах, поэтому мы воспользовались более активным ТХДД, который вводили мышатам в микродозе (10 мкг/кг) однократно за трое суток до воздействия ОАТ. Как показано в табл. 3, по окончании эксперимента через год оказалось, что ТХДД не вызвал образования опухолей печени ни у одной мыши, а в сочетании с ОАТ ослабил канцерогенный эффект последнего в 3,9 раза.

В следующих экспериментах с использованием теста Эймса мы сопоставили влияние ингибирования с помощью ПХФ сульфоконъюгации ОАТ и АБ на их мутагенную активацию печеночными ферментами мышей. Результаты представлены в табл. 4. Как и в ранних опытах Эймса, использовавшего индуцированные феноталом ферменты печени крыс (Ames et al., 1973), индуциро-

ванные ТХДД ферменты печени мышат активировали ОАТ вдвое более эффективно по сравнению с АБ, в то же время ПХФ в обоих случаях снижал число мутантных колоний примерно в одинаковой степени: на 33 % для АБ и на 43 % для ОАТ. В то же время *in vivo*, как было показано в табл. 1, на канцерогенный эффект АБ и ОАТ ПХФ влиял противоположным образом: уменьшал его в первом случае и увеличивал во втором. Таким образом, стимуляция метаболизма ОАТ у мышей *in vivo* уменьшает, а ингибирование (хотя бы на уровне сульфатирования) увеличивает выход индуцированных им опухолей, из чего следует, что непосредственно активным канцерогеном для печени является сам ОАТ (который в этих случаях, по-видимому, более или, соответственно, менее быстро выводится), а не его активированные метаболиты. Можно допустить, что при стимуляции активности монооксигеназ С-гидроксилирование ОАТ, и так резко преобладающее над N-гидроксилированием (Miller, 1970), еще более возрастает, в результате чего относительно большее его количество выводится в составе неактивных конъюгатов с глутатионом и глюкуроновой кислотой при общем уменьшении выхода активированных продуктов сульфоконъюгации. В таком случае подавление активности сульфотрансферазы должно было бы не увеличивать, а уменьшать выход опухолей. Следовательно, опухоли печени индуцируют не мутагенные серные эфиры ОАТ, а либо неметаболизированный ОАТ, либо несulfатированные метаболиты. (Не исключено, что у ОАТ существует особый, отличный от других аминоазокрасителей, путь канцерогенной активации, которая, однако, не сводится к активации мутагенной.)

В табл. 5 представлены результаты сравнительного изучения мутагенных потенциалов ОАТ и известного непеченочного канцерогена 3,4-бензпирена в условиях активации их *in vitro* нативными и преиндуцированными ферментами печени мышей. Результаты были получены в тесте Эймса на бактериях *S. typhimurium* (см. раздел «Материалы и методы»). В отсутствие активирующих ферментов ОАТ так же, как и БП, не увеличивает число мутаций в контролируемом нами локусе бактерий, т.е. в исходном виде не вызывает мутаций типа «сдвиг рамки». В присутствии же S9-фракции из печени мышей, предобработанных индукторами микросомальных монооксигеназ (феноталом, ароклором 1254, ТХДД), оба эти соединения оказываются в равной степени мутагенными, увеличивающими число ревертантных колоний в 4,4–5,1 раза по сравнению с контролем. Что касается активации БП и ОАТ ферментами печени непредобработанных индукторами животных (подсосных и взрослых мышей), то она также имеет место, хотя и на значительно более низком уровне. В этом отношении никаких существенных различий между активацией ОАТ ферментами печени мышей, различающихся по чувствительности к его канцерогенному действию в зависимости от генотипа (СВА, ICR, C57BL) и возраста (подсосные, взрослые), нами не обнаружено.

В то же время при хроническом введении в организм взрослых мышей всех этих линий ОАТ вызывает развитие множественных опухолей печени у 100 % животных и вообще не вызывает лимфом (Каледин и др., 1990,

Table 1. Effect of pentachlorophenol (PCP) on the hepatocarcinogenic action of 4-aminoazobenzene (AB) and ortho-aminoazotoluene (OAT) in suckling CBA mice

Groups and treatment	Number of mice		Number of nodules	
	Total	With tumor nodules in the liver, %	Total	> 2 mm in diameter
1. AB	28	26 (92.9)	15.5 ± 2.3	6.2 ± 1.2
2. PCP + AB	20	17 (85.0)	11.4 ± 2.1	5.5 ± 1.2
Effect of PCP		–8.5 %	–26.5 %	–11.3 %
3. OAT	12	12 (100)	9.4 ± 1.9	2.9 ± 0.7
4. PCP + OAT	16	16 (100)	53 ± 9.1***	19 ± 5.0**
Effect of PCP		0	+463.8 %	+555.2 %
5. PCP	21	3 (14.3)	0.2 ± 0.2	–

Note: The life span of mice having received PCP alone was 403 ± 4.4 days.
Asterisks designate significant differences (***p* < 0.01; ****p* < 0.001) from group 3.

Table 2. Effect of pentachlorophenol (PCP) on the hepatocarcinogenic action of ortho-aminoazotoluene (OAT) in suckling ICR and (C57BL × CBA)F₁ mice

Index	OAT (Group 1)	PCP + OAT (Group 2)
	ICR mice	
Number of mice	29	15
Of them with liver tumor nodules	28 (96.6 %)	15 (100 %)
Life span, days	254 ± 4.3	271 ± 4.6
Mean number of nodules in the liver	3.6 ± 0.59	9.5 ± 1.90**
	(C57BL × CBA)F ₁ mice	
Number of mice	11	9
Of them with liver tumor nodules	9 (81.8 %)	9 (100 %)
Life span, days	300 ± 7.1	286 ± 0.8
Mean number of nodules in the liver	2.7 ± 0.8	11.8 ± 2.2***

Asterisks designate significant differences (***p* < 0.01; ****p* < 0.001) from group 1.

2002a, б), тогда как БП при аналогичном введении мышам вызывает в основном лимфоидные опухоли и опухоли легких, но не печени (de Vries et al., 1997). Таким образом, наличие мутагенных производных БП в печени, где они образуются, не приводит к развитию опухолей печени, так же, как поступление из печени мутагенных метаболитов ОАТ в селезенку не приводит к образованию в ней лимфом.

Обнаружение мутагенной активности у канцерогена традиционно считается доказательством того, что он вызывает развитие опухолей посредством мутаций. Между тем в действительности его канцерогенная и мутагенная активность могут просто совпадать, так же, как в других случаях они проявляются по отдельности (Zeiger, 2001). Классическим примером генотоксического канцерогена считается диэтилнитрозамин (Турусов и др., 2004). Однако, контролируя условия его метаболизма в печени мышей, мы показали обратную зависимость между его канцерогенной и мутагенной активностью, т. е. их несо-

впадение (Kaledin et al., 2015). В качестве другого примера можно привести неканцерогенность для печени мышей однократного облучения их в подсосном периоде заведомо мутагенной дозой (4 Гр) гамма-излучения (Каледин и др., 2002a).

Канцерогенов же, не проявляющих мутагенной активности ни в одном из известных тестов, в настоящее время так много, что их пришлось выделить в особую группу «эпигенетических канцерогенов» (Турусов и др., 2004). Но признание наличия таких канцерогенов, по существу, означает признание неуниверсальности генотоксического механизма канцерогенеза. Более того, в этом случае нельзя исключить, что канцерогенез вообще развивается на эпигенетической основе и генотоксичность канцерогенов является лишь их побочным свойством. Этому, казалось бы, противоречат тысячи публикаций с сообщениями о полиморфизме в опухолях сотен генов, в том числе онкогенов и генов-супрессоров опухолей, мутации в которых могут вносить существенный вклад в их развитие. Но по-

Table 3. Inhibitory effect of the microsomal enzyme inducer 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD) on the carcinogenicity of ortho-aminoazotoluene (OAT) in the liver of CBA suckling male mice

Index / group	Oil + OAT	TCDD + OAT	TCDD
Number of mice	16	13	9
Of them with liver tumors, %	16 (100)	8 (61.5)	0
Life span, days	365 ± 2.8	364 ± 1.8	359 ± 6.9
Liver index, %	4.81 ± 0.24	4.47 ± 0.10	4.26 ± 0.14
Total number of nodules in the liver	6.7 ± 1.1	1.7 ± 0.5***	0
Mean diameter of tumor nodules in the liver, mm	3.8 ± 0.22	0.5 ± 0.3**	0

Note: TCDD at the dose of 10 µg/g body weight was administered to 10-days suckling mice (3 days before administration of OAT). The number and size of tumor nodules were estimated as described in *Materials and methods*.

Asterisks designate significant differences (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) from group 1.

Table 4. Effect of pentachlorophenol (PCP) on the mutagenic activation of 4-aminoazobenzene (AB) and ortho-aminoazotoluene (OAT) by the S9-fraction of liver microsomal enzymes from suckling (C57BL × CBA) F_1 mice pretreated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD)

The activating mixture was supplemented with:	Number of His ⁺ revertant colonies per dish	Induction factor	Effect of PCP
DMSO (diluent)	41 ± 0.7	1.00	
PCP	39 ± 1.8	0.95	
AB	84 ± 2.7	2.05	
AB + PCP	56 ± 2.0*	1.37	–33.4 %
OAT	158 ± 3.9	3.85	
OAT + PCP	90 ± 2.0*	2.20	–43.0 %

Note: Mutagenicity of carcinogens was assessed in the Ames test as described in *Materials and methods*.

The doses of AB and OAT were 20 µg and PCP, 10 µg per dish.

Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) from the corresponding data in the foregoing row.

Table 5. Mutagenicity of benzo[a]pyrene (BP) and ortho-aminoazotoluene (OAT) in the Ames test on *S. typhimurium* under metabolic activation by the intact or preinduced S9-fraction of mouse liver microsomal enzymes

Donors of S9-fraction	Number of His ⁺ revertant colonies			
	BP		OAT	
	Number per dish	Induction factor	Number per dish	Induction factor
Control (without S9-fraction)	34 ± 2.1	1.0	35 ± 1.9	1.1
Liver of suckling CBA mice without enzyme induction	88 ± 4.8	2.7	62 ± 4.9	1.9
Liver of suckling ICR mice without enzyme induction	73 ± 1.0	2.2	52 ± 2.1	1.6
Liver of adult C57BL males without enzyme induction	78 ± 7.4	2.4	63 ± 1.4	1.9
Liver of adult C57BL mice induced with phenobarbital	144 ± 1.7	4.4	167 ± 3.2	5.1
Liver of adult C57BL mice induced with Aroclor 1254	160 ± 0.9	4.8	169 ± 0.6	5.1
Liver of suckling F_1 (BL × CBA) mice induced with TCDD	–	–	163 ± 3.7	4.9

Note: The mean number of revertant colonies without carcinogens was 33 ± 3.6 per dish. The induction factor is the ratio between the number of colonies in the experimental groups and the number of colonies in the control.

лиморфизм, обнаруживаемый обычно в зрелых опухолях, нарастает по мере их прогрессии, которая идет спонтанно или под влиянием немутагенных промоторов, как правило, уже в отсутствие канцерогена, и ничего не может сказать о механизме инициирующего действия последнего.

Определяя рак как генетическую болезнь, Г.П. Георгиев (1999. С. 17) констатирует, что он может быть связан «с потерей, или повреждением, или активацией, или, наконец, привнесением извне определенных генов». Собственно генотоксическими при этом являются потеря и повреждение и только частично активация в той части, в которой она – результат повреждения или реаранжировки этих генов. Другой путь увеличения активности онкогена, связанный с усилением синтеза матричных РНК и в итоге белкового продукта онкогена и его накопления в клетке, может реализоваться через регуляцию этого синтеза, т. е. эпигенетически, как это происходит в нормальном онтогенезе и при репаративных процессах. В настоящее время имеются соображения относительно того, как могут действовать канцерогены на уровне не структуры, а функции генома (Nguen-Ba, Vasseur, 1999; Jones, Baylin, 2007; Kaledin et al., 2014a, b, 2015). Обсудить их мы надеемся в следующем сообщении.

Acknowledgments

Работа выполнялась в рамках государственного задания (проект № 0324-2015-0003).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abilev S.K., Glazer V.M., Aslanyan M.M. Osnovy mutagenеза i genotoksikologii [Fundamentals of Mutagenesis and Genotoxicology]. Moscow; Saint-Petersburg, 2012. (in Russian)
- Ames D.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1973;70: 2281-2285.
- Delclos K.B., Miller E.C., Miller J.A., Liem A. Sulfuric acid esters as major ultimate electrophilic metabolites of 4-aminoazobenzene and its N-methyl derivatives in infant male C57BL/6J × C3H/HeJ F₁ (B6C3F₁) mice. *Carcinogenesis.* 1986;7:277-287.
- Delclos K.B., Tarpley W.G., Miller E.C., Miller J.A. 4-aminoazobenzene and N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene as equipotent hepatic carcinogens in male C57BL/6 × C3H/He F₁ mice and characterization of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoazobenzene as the major persistent hepatic DNA-binding dye in these mice. *Cancer Res.* 1984;44:2540-2550.
- De Vries A., Dolle M.E.T., Broekhof J.L.M., Muller J.J.A., Kroese E.D., van Kreijl C.F., Capel P.J.A., Vijg J., van Steeg H. Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/*lacZ* transgenic mice after oral treatment with benzo[*a*]pyrene: correlation with tumor development. *Carcinogenesis.* 1997;18:2327-2332.
- Fennel T.R., Wiseman R.W., Miller J.A., Miller E.C. Major role of hepatic sulfotransferase activity in the metabolic activation, DNA adduct formation, and carcinogenicity of 1'-hydroxy-2',3'-dehydroestragole in infant male C57BL/6J × C3H/HeJ F₁ mice. *Cancer Res.* 1985;45:5310-5320.
- Frolova T.S., Sinitsyna O.I., Kaledin V.I. The mutagenic activities of four aminoazo compounds with different carcinogenicities for rat liver in the Ames test. *Biophysics.* 2015;60:818-822.
- Georgiev G.P. How a normal cell is transformed into a cancer one. *Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal = Soros Educational Journal.* 1999;4:17-22. (in Russian)
- Jones P.A., Baylin S.B. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128: 683-692.
- Kaledin V.I., Gulyaeva M.R., Serova I.A., Ilnitskaya S.I., Nikitenko E.V., Schkurupii V.A. On sensitivity of adult males of C57BL/6 and C3H strains of mice to hepatic tumor induction by ortho-aminoazotoluene. *Byulleten SO RAMN = Bulletin of SB RAMS.* 2002b;4(106):100-103. (in Russian)
- Kaledin V.I., Gulyaeva L.F., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Bulychева T.E. Glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase in the liver is impaired by activated metabolites of carcinogens. *Doklady Akademii nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR.* 1997;357:126-129. (in Russian)
- Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I. Metabolism inhibition enhances the carcinogenic action of o-aminoazotoluene in the mouse liver, whereas activation inhibits it. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology.* 2011;57:216-220. (in Russian)
- Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Baginskaya N.V., Kholodar A.V., Obut T.A. Effect of phenobarbital and tyroxine on carcinogenesis induced in mice by nitrosoethylurea and diethylnitrosamine. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal.* 2005;91:1481-1491. (in Russian)
- Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Ovchinnikova L.P., Popova N.A., Bogdanova L.A., Morozkova T.S. Mutagenic activation and carcinogenicity of aminoazo dyes ortho-aminoazotoluene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in experiments on suckling mice. *Biophysics.* 2014a;59:431-435.
- Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Baginskaya N.V., Bogdanova L.A., Perepechaeva M.L., Grishanova A.Yu. Inhibitory effect of ortho-aminoazotoluene on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in suckling mice. Phenomenon and possible mechanism. *Biophysics.* 2014b;59:635-641.
- Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Koval O.A., Pyshnaya B.A., Gulyaeva L.F. Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by the activated metabolites of ortho-aminoazotoluene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2015;19(1):136-143. (in Russian)
- Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Vasyunina E.A., Popova N.A., Bogdanova L.A., Perepechaeva M.L., Grishanova A.Yu. The effect of changes in Cyp2e1 activity in the liver on toxicity and carcinogenicity of diethylnitrosamine in mice. *Biophysics.* 2015;60:970-976.
- Kaledin V.I., Serova I.A., Semenova L.A. Different predisposition to development of spontaneous and induced tumors of the liver in mice of different strains and their hybrids. *Eksperimentalnaya onkologiya = Experimental Oncology.* 1990;12:28-30. (in Russian)
- Kaledin V.I., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P., Ronichevskaya G.M., Zvereva L.N., Ilnitskaya S.I. Search for correlation between the oncogenic and mutagenic effects of chemical carcinogens and gamma-irradiation in mice. *Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2002a;21-22:11-19. (in Russian)
- Kaledin V.I., Zakharova N.P. Vliyaniye gepatokantserogennykh soedineniy na gormonalnyuyu induktsiyu tirozinaminotransferazy v pecheni chuvstvitelnykh i rezistentnykh zhivotnykh [The influence of hepatocarcinogenic compounds on hormonal induction of tyrosine aminotransferase in the liver of sensitive and resistant animals]. *Issledovaniya po indukcii i metastazirovaniyu zlokachestvennykh opukholey u eksperimentalnykh zhivotnykh [Studies on Tumor Induction and Metastasis in Experimental Animals].* Novosibirsk: ICG CO AN SSSR Publ., 1984;146-185. (in Russian)
- Miller J.A. Carcinogenesis by chemicals: an overview. *Cancer Res.* 1970;30:658-664.
- Miller J.A., Miller E.C. Kantserogennyye aminoazosodineniya [The carcinogenic aminoazodyes]. *Uspekhi v izuchenii raka [Advances in Cancer Research].* Moscow, Inostrannaya literatura Publ., 1955;1: 7-71. (in Russian)

- Miller E.C., Miller J.A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*. 1981;47:2327-2345.
- Miller E.C., Swanson A.B., Phillips D.H., Fletcher T.L., Liem A., Miller J.A. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res*. 1983;43:1124-1134.
- Miller J.A., Miller E.C. The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr. Exptl. Tumor Res*. 1969;11:273-301.
- Nguyen-Ba G., Vasseur P. Epigenetic events during the process of cell transformation induced by carcinogens (review). *Oncol. Rep*. 1999; 6(4):925-932.
- Ovchinnikova L.P., Bogdanova L.A., Kaledin V.I. Mutagenic activation diminishes the carcinogenicity of ortho-aminoazotoluene in the mouse liver. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;154:623-628. (in Russian)
- Turusov V.C., Belitskii G.A., Pylev L.N., Koblyakov V.A. Mekhanizmy deystviya i klassifikatsiya khimicheskikh kantserogenov [The action pathways and classification of chemical carcinogens]. *Kantserogenez*. Red. D.G. Zaridze [Carcinogenesis. Ed. by D.G. Zaridze]. Moscow, Meditsina Publ., 2004;204-225. (in Russian)
- Weisburger J.H., Yamamoto R.S., Williams G.M., Grantham P.H., Matsushima T, Weisburger E.K. On the sulfate ester of N-hydroxy-2-fluorenylacetamide as a key ultimate hepatocarcinogen in the rat. *Cancer Res*. 1972;32:491-500.
- Williams G.M., Klaiber M., Parker S.E., Farder E. Nature of early appearing, carcinogen-induced liver lesions resistant to iron accumulation. *J. Nat. Cancer Inst*. 1976;57:157-165.
- Zborovskaya I.B. Molekulyarno-biologicheskie issledovaniya onkogenov i genov-supressorov opukholevogo rosta v klinicheskoy praktike [Molecular study of oncogenes and genes suppressing tumor growth in clinical practice]. *Kantserogenez*. Red. D.G. Zaridze [Carcinogenesis. Ed. by D.G. Zaridze]. Moscow, Meditsina Publ., 2004. (in Russian)
- Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? *Mutat. Res*. 2001;492:29-38.

Режим однократной инъекции препарата двуцепочечной ДНК после каждой инъекции циклофосфана, приводящий к эрадикации первичного асцита Кребс-2

Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.М. Минкевич¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1, 2}, Я.Р. Ефремов^{1, 2},
С.И. Байбородин^{1, 2}, В.А. Рогачев¹, А.С. Проскурина¹, О.С. Таранов³, Е.И. Верещагин⁴, А.А. Останин⁵,
Е.Р. Черных⁵, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹✉

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

В наших предыдущих работах был разработан режим элиминации первичного асцита на модели мышинной опухоли Кребс-2. В основе режима лежат многократные инъекции препаратов двуцепочечной ДНК, приходящиеся как на фазу NER, так и на фазу гомологической рекомбинации процесса репарации межцепочечных сшивков после обработки животных циклофосфаном. Развивающийся вторичный асцит у обработанных таким образом животных свидетельствовал о том, что при такой обработке стволовые иницирующие раковые клетки не полностью элиминируются и впоследствии дают рецидив заболевания. Характерный симптомокомплекс системной воспалительной реакции предполагал токсическое воздействие многократных инъекций препарата ДНК. На основании этих фактов был разработан технологически простой режим синергичного действия цитостатика циклофосфана и препарата двуцепочечной ДНК, позволяющий полностью элиминировать первичный развитый асцит опухоли Кребс-2, со снижением уровня токсического воздействия на экспериментальных животных. В отличие от обсуждавшегося ранее режима, в настоящей разработке многократные инъекции препаратов двуцепочечной ДНК сведены к одной инъекции в точку демаркации фаз репарации NER и гомологической рекомбинации в каждом репаративном цикле. В результате такой обработки также удалось достичь 8-суточной ремиссии асцита Кребс-2 у всех животных в группе, что было показано при режиме многократных инъекций препаратов двуцепочечной ДНК. Средняя продолжительность жизни экспериментальных животных при однократных инъекциях увеличилась, что свидетельствует об уменьшении токсического воздействия терапии на животных.

Ключевые слова: двуцепочечная ДНК; циклофосфан; асцит Кребс-2; стволовые иницирующие раковые клетки; репарация; ремиссия; NER; гомологическая рекомбинация; системная воспалительная реакция; полиорганная недостаточность.

Eradication of Krebs-2 primary ascites via a single-injection regimen of cyclophosphamide and double-stranded DNA

E.A. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.M. Minkevich¹,
V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1, 2}, Ya.R. Efremov^{1, 2},
S.I. Baiborodin^{1, 2}, V.A. Rogachev¹, A.S. Proskurina¹,
O.S. Taranov³, E.I. Vereschagin⁴, A.A. Ostanin⁵,
E.R. Chernykh⁵, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹✉

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

⁴ Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

⁵ Scientific Research Institute of Clinical Immunology, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

Previously, we reported on the development of a therapeutic regimen allowing eradication of primary murine Krebs-2 ascites transplants. This protocol involved multiple injections of dsDNA preparations administered during the NER and HR phases of repair of interstrand DNA cross-links induced by prior cyclophosphamide treatments. Mice treated under this protocol frequently developed secondary ascites, which indicated that some tumor-inducing cancer stem cells could survive the treatment and caused relapse. Further, we observed that animals receiving multiple dsDNA injections developed pronounced systemic inflammatory response. This prompted us to develop a more straightforward treatment regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and dsDNA preparations, which would allow complete eradication of established primary Krebs-2 ascites and also be less toxic for the treated animals. This protocol relies on a precisely timed single injection of dsDNA during the NER/HR transition period of each repair cycle. Under this protocol, 8-day remission of Krebs-2 engrafted mice was achieved, which was similar to the

results of the multiple-injection treatment schedule. We observed an increase in the average life span of Krebs-2 transplanted mice on a single-injection regimen, which was consistent with reduced toxicity of such treatment.

Key words: double-stranded DNA; cyclophosphamide; Krebs-2 ascites; tumor-initiating cancer stem cells; repair; remission; NER; homologous recombination; systemic inflammatory reaction; multiple organ failure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., Николин В.П., Попова Н.А., Ефремов Я.Р., Байборodin С.И., Рогачев В.А., Проскурина А.С., Таранов О.С., Верещагин Е.И., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Режим однократной инъекции препарата двуцепочечной ДНК после каждой инъекции циклофосфана, приводящий к эрадикации первичного асцита Кребс-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):716-722. DOI 10.18699/VJ16.161

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Ya.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Taranov O.S., Vereschagin E.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Eradication of Krebs-2 primary ascites via a single-injection regimen of cyclophosphamide and double-stranded DNA. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):716-722. DOI 10.18699/VJ16.161

В предыдущих статьях представленного цикла исследований были приведены результаты двух основополагающих экспериментов. В первом эксперименте мышам с развитым асцитом через 18 ч после введения циклофосфана (ЦФ) инъектировали препарат двуцепочечной ДНК (дцДНК) человека однократно, и обработанный таким образом асцит перевивали интактным мышам в количестве $0,3 \times 10^6$ клеток в виде солидных внутримышечных трансплантатов (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016а, рис. 2, в2). В результате эксперимента у трех из пяти мышей внутримышечный трансплантат не прижился.

Во втором эксперименте мышам-асцитоносам вводили нативную ДНК человека (hDNA) в режиме 1–18 ч и смесь нативной и модифицированной ДНК лосося (ssDNA/ICL-ssDNA mix) в режиме 18–30 ч после инъекции ЦФ (Поттер и др., 2016б, рис. 4, б). В этом случае у всей группы мышей на 3-и сутки после первой инъекции ЦФ (7-е сутки после прививки) первичный асцит резорбировался. Время ремиссии у 100 % животных составило 9 суток. Развившийся вторичный асцит имел геморрагические характеристики. Патоморфологический анализ мышей с развитым вторичным асцитом, забитых в агонистической стадии болезни, показал, что у мышей, длительно обрабатываемых дцДНК, была индуцирована системная воспалительная реакция (СВР), развившаяся в полиорганную недостаточность (ПОН). Одной из главных характеристик ПОН является катастрофическая эрозия кишечного эпителия и связанное с этим разрушение барьерной функции кишечника (Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016а, б).

Согласно этим фактам, а также данным, полученным в наших предыдущих работах (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016а), точка 18 ч после введения ЦФ является пограничной точкой, разделяющей две фазы процесса репарации межцепочечных сшивок (МЦС). До 18 ч идет и завершается стадия NER, а с 18 до 30 ч идет и завершается стадия гомологичной рекомбинации (ГР). Нативная дцДНК человека интерферирует NER, тогда как «исковерканная» ICL-ssDNA интерферирует стадию ГР. Однократная инъекция ДНК в точку 18 ч после введения ЦФ может полностью разрушить перевивочный потенциал солидного трансплантата (Dolgova et al., 2014; Поттер

и др., 2016а, рис. 2, в2). На основании этих фактов была разработана компиляция, которую можно сформулировать следующим образом. Если через 18 ч после введения ЦФ ввести препарат дцДНК, состоящий из смеси нативной hDNA и ssDNA mix в определенной пропорции, то фрагменты нативной ДНК будут губительно для стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК) интерферировать конечные этапы NER, а «исковерканные» фрагменты ДНК спермы лосося будут губительно для СИРК интерферировать начальные этапы ГР. Таким образом можно полностью перекрыть все возможности для СИРК корректно завершить репарацию МЦС или изменить их раковый статус и тем самым элиминировать из асцита опухолевое начало опухоли. Повторение аналогичной процедуры в фазу клеточного цикла (через 36 ч после первой инъекции ЦФ), когда остаточные раковые клетки, находившиеся при первой обработке в нечувствительной для них фазе клеточного цикла (G2-M), будут доступными (в следующей по порядку после первой обработки фазе G1-S) для действия препаратов и одновременно произойдет повторное запираание в S-фазе готовящихся выйти из нее клеток первой очереди воздействия, позволит окончательно завершить деструкцию раковых клеток, свободно расположенных в асцитном бульоне. Трехкратное повторение такой процедуры с большой долей вероятности охватит всю популяцию СИРК и должно привести к полной потере графтом опухолевого потенциала, что проявится в резорбции первичного асцита, как это показано для режима многократных инъекций препаратов ДНК.

Материалы и методы

Подробная информация об экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося (препарат ДНК лосося выделяли аналогичным образом из молок лосося), подготовке кросс-линкированного нитроген-мустандом препарата ДНК представлена в статье (Alyamkina et al., 2015).

Методы статистической обработки данных описаны в статье (Поттер и др., 2016а). Методики введения препаратов циклофосфана, экзогенной ДНК и антибиотика гентамицина, активации адаптивного иммунитета, пересадки клеток костного мозга, оценки ремиссии асцитной опухоли Кребс-2 детально изложены в работе (Поттер и др., 2016б).

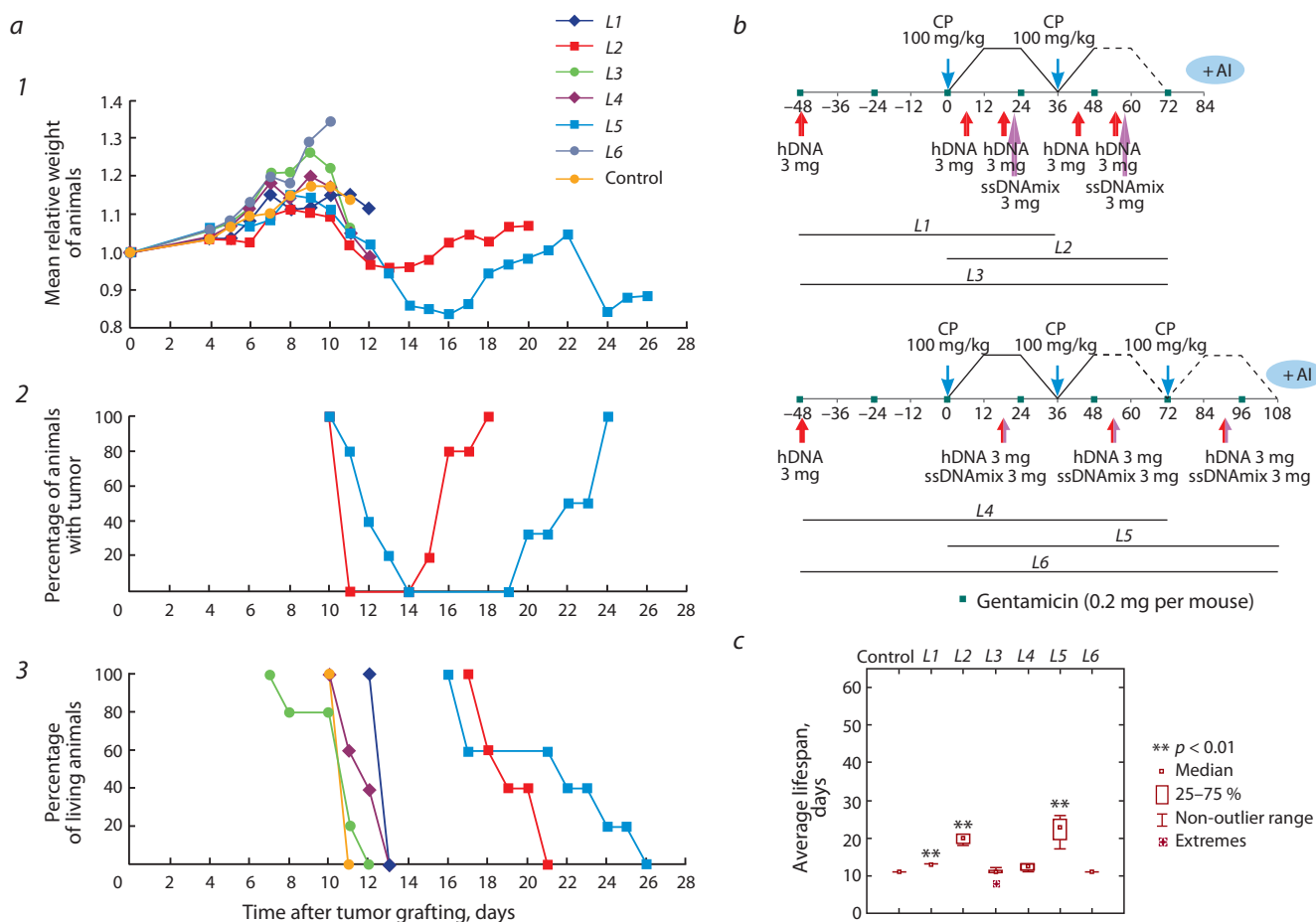


Fig. 1. Analysis of the synergistic action of CP and dsDNA preparations (Here and in subsequent figures: hDNA, human DNA; ssDNAmix, salmon sperm DNA mix) on the ascites form of established Krebs-2 tumors: (I) combined with the additional protocol modification, i.e. activation of adaptive immunity (AI), adapted from Alyamkina et al. (2009, 2010a, b, c).

(a) Quantitative analysis of experimental animals: 1, changes in mouse weight (values are normalized by the initial weight), 2, ascites regression across different experimental groups, 3, survival curve; (b) Schematic presentation of injection schedules used in groups L1-L6; the duration of an indicated therapy is shown by horizontal lines below the schemes; (c) Analysis of the average lifespans of animals from different treatment groups (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Результаты

Для оценки эффективности воздействия на асцит Krebs-2 режима единичной инъекции комплексной дцДНК через 18 ч после введения ЦФ и повтора процедуры еще два раза, были проведены три эксперимента, в которых анализировалось состояние обработанных мышей-асцитоносов на протяжении времени эксперимента. В проведенной серии экспериментов охарактеризован также режим, в котором оценивали терапевтическое действие препарата дцДНК при его введении в различные временные интервалы до инъекции ЦФ. Дополнительно охарактеризована группа, в которой введение двух препаратов ДНК было разнесено по времени. Первоначально вводили hDNA (18 ч после введения ЦФ), а затем ICL-ssDNA (21 ч после введения ЦФ). Также оценивался режим «наложенных на зону ремиссии обработок, аналогичных первой», проведенной в середине временного отрезка ремиссии, которая приводила к полному исчезновению асцита. Все схемы были дополнены введением антибиотика гентамицина для купирования бактериального заражения животных.

В некоторых схемах дополнительно выполнена активация адаптивного иммунитета (АИ) (Alyamkina et al., 2010a-c) и трансплантация клеток костного мозга (ККМ). Результаты экспериментов представлены на рис. 1-3.

Для основного режима «ЦФ+ДНК через 18 ч» трехкратно в 0, 36 и 72 ч на 4-е сутки от перевивки асцита получены следующие основные результаты. Четырехсуточный асцит продолжал расти и увеличиваться в объеме до 10-12 суток после введения ЦФ либо останавливался в росте через 1-2 суток после обработки (см. рис. 1, a1 и рис. 2, a1). Далее наблюдался синхронный, катастрофически быстрый уход асцитной жидкости у всей группы экспериментальных животных. Одновременно уменьшался вес животных (в среднем по 1,5-2 г в сутки) и формировались «рубцы беременности». Мыши имели внешний вид животных с полным отсутствием асцита. Вторичный асцит развивался в 100 % случаев через 5-7 дней после полной ремиссии у всей группы животных (см. рис. 1, a2 и рис. 2, a2, кривые L4, L6). Его объем и внешний вид значительно отличались от первичного ас-

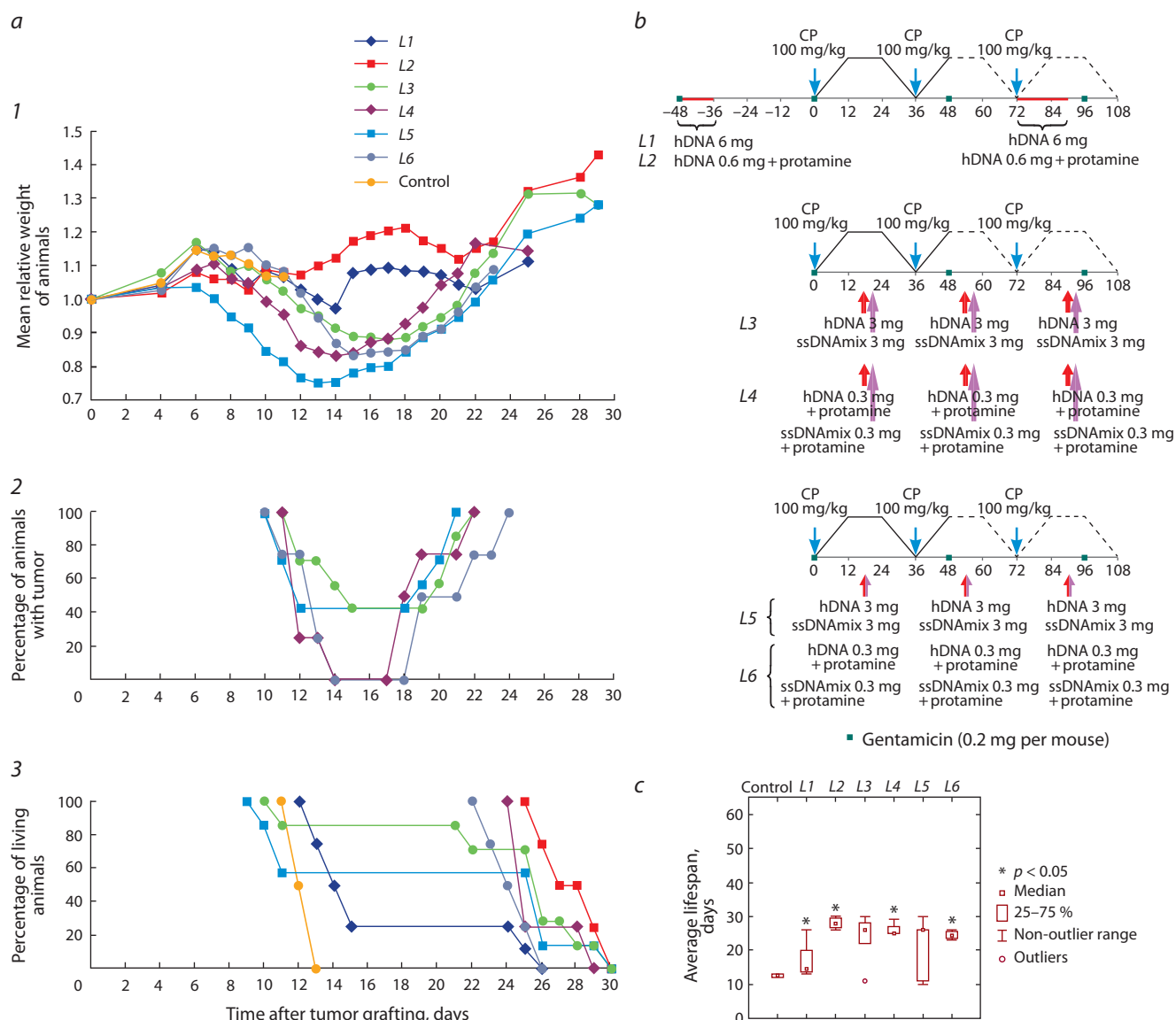


Fig. 2. Analysis of the synergic action of CP and DNA preparations (hDNA and ssDNAmix) on the ascites form of an established Krebs-2 tumor (II).

(a) Quantitative analysis of experimental animals: 1, changes in mouse weight (Values are normalized by the initial weight); 2, ascites regression across different experimental groups; 3, survival curve. (b) Schematic presentation of injection schedules used in groups L1–L6; (c) Analysis of the average lifespans of animals from different treatment groups (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

цита. Вторичный асцит носил признаки геморрагического разложения. Дополнительно в группе с аналогичной обработкой использовался в качестве протектора ДНК белок протамин. Оказалось, что для достижения одинакового терапевтического эффекта при использовании протамин требуется в 10 раз меньшее количество препарата дцДНК (см. рис. 2, а, б, кривые L2, L4, L6).

В проведенных экспериментах параллельно с основным терапевтическим режимом нами протестированы режимы введения препарата дцДНК до обработки ЦФ (см. рис. 1, а, б, кривые L1, L3, L4, L6; рис. 2, а, б, кривые L1, L2) и режим разнесенного во времени введения двух составляющих комбинированной формы ДНК (см. рис. 1, а, б, кривые L1–L3, рис. 2, а, б, кривые L3, L4). Также опробо-

ван режим инъекций препарата ДНК человека каждые два часа после третьей инъекции цитостатика (см. рис. 2, а, б, кривые L1, L2). Полученные результаты позволили констатировать, что режимы предварительного введения комбинированной ДНК и введения двух составляющих комбинированной формы ДНК, разнесенного во времени, в определенных комбинациях имеют достоверный противораковый эффект по сравнению с контролем (см. рис. 1, а, б, кривые L1, L2; рис. 2, а, б, кривые L1, L2, L4).

Дополнительно были разработаны и проведены эксперименты, в которых использовался подход наложения на зону ремиссии повторных обработок в режиме «ЦФ + ДНК через 18 ч» на 11-е сутки после первой инъекции ЦФ (на 15-е сутки после прививки асцита). Доза цитостатика при

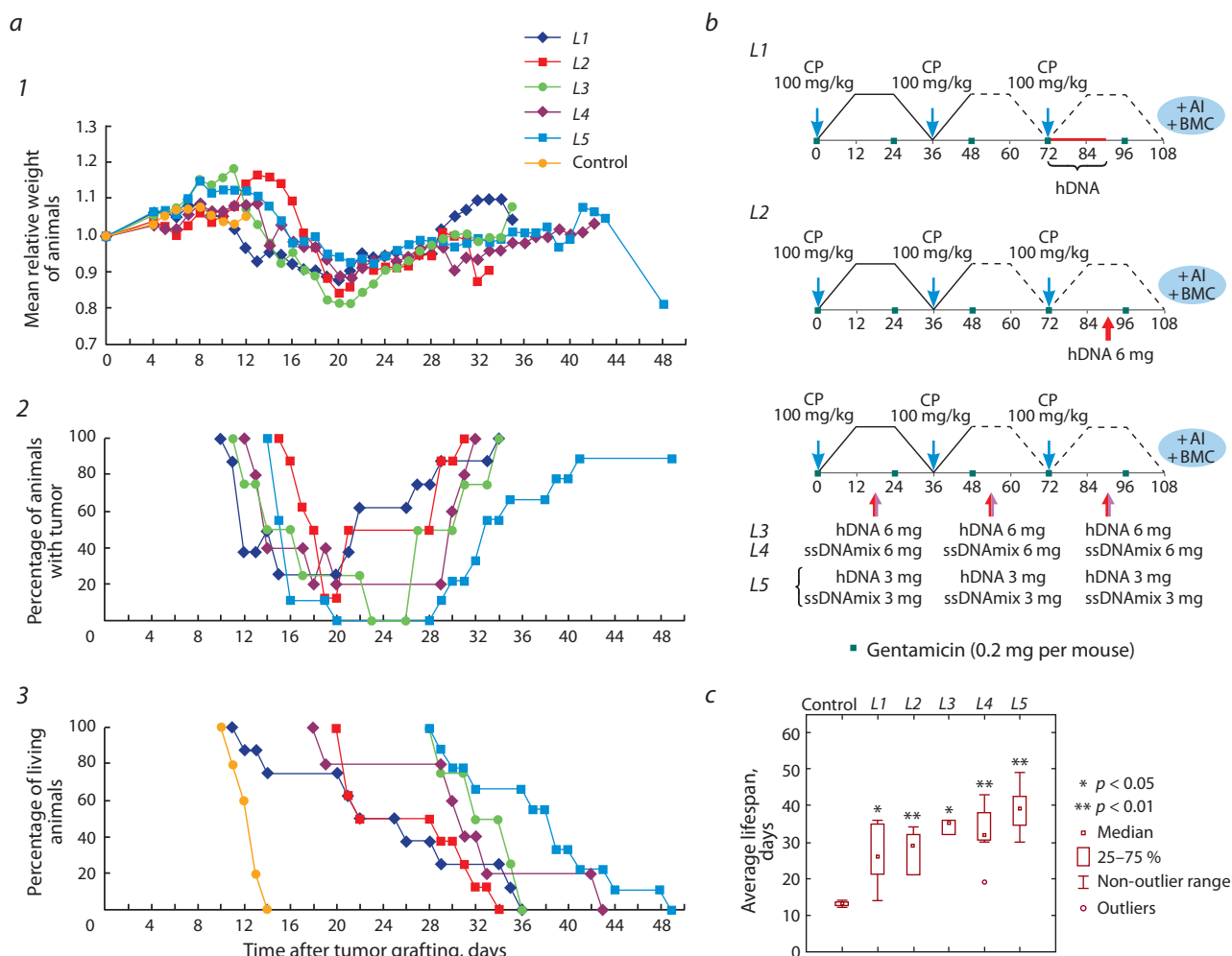


Fig. 3. Analysis of the synergic action of CP and dsDNA preparations (hDNA and ssDNAmix) on the ascites form of established Krebs-2 tumors (III) combined with additional protocol modifications, i.e. activation of adaptive immunity (AI), adapted from Alyamkina et al. (2009, 2010a, b, c) and bone marrow transplantation 15 days following ascites injection (5×10^5 cells/animal).

(a) Quantitative analysis of experimental animals: 1, changes in mouse weight (values are normalized by the initial weight), 2, ascites regression across different experimental groups, 3, survival curve; (b) Schematic presentation of injection schedules used in groups L1–L5; (c) Analysis of the average lifespans of animals from different treatment groups (Wilcoxon–Mann–Whitney test).

повторной обработке была уменьшена со 100 до 50 мг/кг. Результаты экспериментов представлены на рис. 3 и 4.

Оказалось, что при таком экспериментальном решении участок ремиссии, обнаруженный в первых экспериментах, был смещен в сторону от инъекции ЦФ на 6–10 суток в отличие от основного режима («ЦФ + ДНК через 18 ч», повторенный трижды с интервалом 36 ч между инъекциями ЦФ) и продолжался 8 суток в отличие от 5-ти для основного режима. Мыши погибли в 100 % случаев. Асцит носил признаки геморрагического разложения.

Обсуждение

В более ранних статьях (Поттер и др., 2016а, б) и в настоящем исследовании были проведены многочисленные эксперименты по характеристике наиболее эффективных режимов терапии экспериментальных мышей, несущих асцитный трансплантат Кребс-2, препаратами дцДНК в синергизме с цитостатиком ЦФ. Получены результаты,

свидетельствующие о вылечивании мышей от первичного ракового асцита. Наиболее эффективный режим, приводящий к элиминации первичного асцита, состоял из трех инъекций цитостатика ЦФ с интервалом 36 ч (в конечные точки каждого репаративного цикла) и дополнительных инъекций сложнокомпозиционного препарата дцДНК через 18 ч после каждой инъекции ЦФ (в точку демаркации двух фаз – NER и ГР репарации МЦС, индуцированных ЦФ).

Однако через 5–9 дней полной ремиссии у всей группы животных, излечившихся от первичного асцита, формировался вторичный асцит. Его развитие сопровождалось характерным симптомокомплексом, описанным в наших предыдущих работах (Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016б), и мыши погибали. Вторичный асцит имел другие клеточные характеристики и никогда не развивался до размеров первичного ракового асцита. Результаты патоморфологического анализа органов и тканей мышей

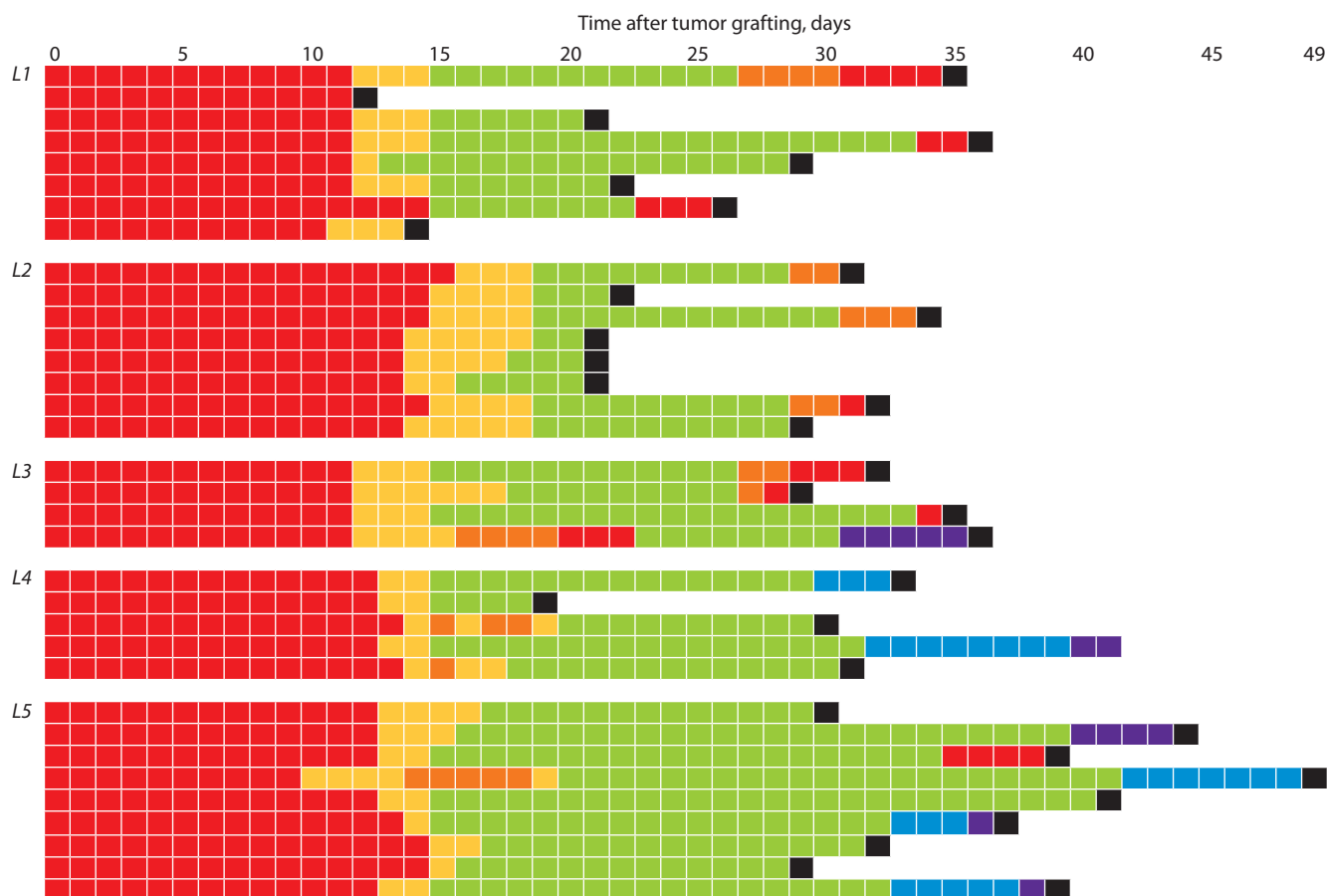


Fig. 4. Graphic representation of Krebs-2 ascites growth in experimental animals.

RED, established ascites, YELLOW, ascites regression, GREEN, no ascites detectable, ORANGE, ascites relapse, BLUE, ascites is absent, solid tumor is present, LILAC, both ascites and solid tumor are present, BLACK, death. Groups L1–L5 correspond to the group numbering used in Figures 3, b.

в агонистической фазе симптомокомплекса (Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016) свидетельствовали о том, что в организме животных развивается полиорганная недостаточность (ПОН). По-видимому, именно разрушение основных функциональных систем организма является конечной причиной гибели животных.

В современной экспериментальной и клинической практике известно такое понятие, как метрономная терапия (Scharovsky et al., 2009). В основном этот подход используется для удаления Трег-лимфоцитов. Метрономность, или частая обработка небольшими дозами, может иметь следующий принципиальный смысл: появляется большая вероятность попадания в один из неопределенных (физиологических, молекулярных или временных) причинных факторов симптома. Повторяемость такого случайного, но обязательного попадания становится определяющим фактором успешной терапии заболевания. Принцип «часто, но помалу, и обязательно попадешь» являлся принципиальным в разрабатываемом нами подходе в терапии экспериментального рака Krebs-2. В этой связи первоначально используемый нами подход с применением многократных инъекций препарата ДНК в течение одного репаративного цикла можно было классифицировать как метрономную обработку экспериментальных мышей.

Результаты исследований показали, что метрономность воздействия в экспериментах в своей основе связана с неопределенностью мишени воздействия проводимой терапии.

Глубокий анализ, проведенный нами по всей совокупности результатов исследований, позволяет предполагать, что в терапии опухоли Krebs-2 существуют несколько принципиальных моментов, опирающихся на биологические явления, найденные в лаборатории и составляющие основу разрабатываемого терапевтического подхода, который на первых этапах генеза можно было рассматривать как удачную метрономную терапию. Найденные принципиальные факторы и их применение объединяются в следующую стратегию воздействия на асцитную опухоль на примере экспериментальной опухоли Krebs-2.

Базовые феномены

1. СИРК интернализуют фрагменты дцДНК (Dolgova et al., 2014);
2. Фрагменты дцДНК, доставленные во внутриклеточное пространство СИРК, при репарации МЦС интерферируют процесс таким образом, что СИРК или погибают, или лишаются своего туморогенного статуса (Dolgova et al., 2014).

Основные факторы успешной терапии первичного асцита Кребс-2

1. Повторяемость инъекций ЦФ. Первые три инъекции ЦФ одна за другой уменьшают количество клеток, остающихся не подверженными воздействию ЦФ. Каждый раз при введении ЦФ через 36 ч после предыдущей инъекции новая обработка попадает на время, когда часть популяции интернализирующих TAMRA-меченый ДНК-зонд клеток, находившихся в G2-M-фазе клеточного цикла и не чувствительных к ЦФ, переходит в G1-S-фазу и становится чувствительной к обработке цитостатиком. Одновременно повторная обработка запирает уже обработанные асцитные клетки в той же S-фазе (Поттер и др., 2016б).
2. При добавлении в реакцию сложнокомпонентной ДНК (hDNA + ssDNAmix) в точку демаркации NER и ГР (через 18 ч после каждой инъекции ЦФ) происходит одновременная интерференция репаративного процесса по двум векторам – NER и ГР. В ходе трех обработок подавляющая часть популяции СИРК погибает, опухоль в значительной степени теряет туморогенное начало (настоящее исследование).
3. Композиция ДНК при ассоциации с протамином понижает терапевтическую дозу препарата в 10 раз и снижает токсический эффект обработки, что проявляется в снижении частоты возникновения симптомов ПОН у экспериментальных мышей (Долгова и др., 2009; настоящее исследование).
4. В схемах применения эффективного режима в обязательном порядке должна присутствовать антибиотиковая терапия на протяжении всего времени лечения, а также особая диета, используемая при лечении сепсиса (Peshkova et al., 2015).
5. Для купирования последствий масштабного одновременного разрушения асцитных раковых клеток необходимо проводить предлагаемые в пунктах 1, 2, 6 терапевтические процедуры при развитии асцита, характеризующегося объемом 1/10 от веса тела мыши, в котором содержится 200–300 млн асцитных раковых клеток (Поттер и др., 2016а).
6. Доза единичной инъекции вводимого сложнокомпонентного препарата ДНК должна составлять 6 мг препарата на мышь (настоящее исследование).

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-00191.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Orishchenko K.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combined therapy with cyclophosphamide and DNA preparation inhibits the tumor growth in mice. *Genet Vaccines Ther.* 2009;7(1):12. DOI 10.1186/1479-0556-7-12.

Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gel'fgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity. *Cell. Immunol.* 2010a;262(2):120-126.

Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells *in vitro*. *Cell. Immunol.* 2010b;266(1):46-51.

Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Efremov Y.R., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Sidorov S.V., Ponomarenko D.M., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. A strategy of tumor treatment in mice with doxorubicin-cyclophosphamide combination based on dendritic cell activation by human double-stranded DNA preparation. *Genet. Vaccines Ther.* 2010c;8:7. DOI 10.1186/1479-0556-8-7.

Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015;15:32. DOI 10.1186/s12935-015-0180-6.

Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.

Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Likhacheva A.S., Alyamkina E.A., Sebeleva T.E., Chernykh E.R., Gelfgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. The leukocyte-stimulating action of protamine-protected exogenous DNA in -myelosuppression induced in mice by cyclophosphane. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology.* 2009;55(6):761-764. (in Russian)

Peshkova I.V., Bogachev S.S., Drobyazgin E.A., Chikinev Y.V., Mitrofanov I.M., Piontkovskaya K.A., Vereschagin E.I. Effect of glutamine on the nucleic acids exchange during the perioperative period in reconstructive esophagus surgery. *J. Nutr. Health Food Eng.* 2015;2(4):00058. DOI 10.15406/jnhfe.2015.02.00058.

Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kozel A.V., Rogachev V.A., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016a;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116. (in Russian)

Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016b;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117. (in Russian)

Scharovsky O.G., Mainetti L.E., Rozados V.R. Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr. Oncol.* 2009;16(2):7-15.



Разработка регламента терапевтического режима, основанного на синергичном действии циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК, приводящего к полному вылечиванию экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мыши Кребс-2

Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.С. Проскурина¹, Я.Р. Ефремов^{1, 2}, О.С. Таранов³, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1, 2}, Т.Д. Дубатолова⁴, Д.Д. Петрова⁵, Е.И. Верещагин⁶, А.М. Минкевич¹, О.М. Андрушкевич^{1, 2}, С.И. Байбородин^{1, 2}, В.А. Рогачев¹, А.А. Останин⁷, Е.Р. Черных⁷, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

⁵ Специализированный учебно-научный центр Новосибирского государственного университета, Новосибирск, Россия

⁶ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

⁷ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Совокупность всех данных, полученных в работах настоящего цикла исследований, определила основную логику создания нового сложнокomпозиционного препарата на основе двуцепочечной ДНК, применение которого в рамках нового терапевтического режима привело к полному вылечиванию мышей от асцита Кребс-2. Рассматривается предполагаемый механизм разрушения опухолевого начала опухоли Кребс-2, который заключается в элиминации из опухоли TAMRA+ стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК). Проведен анализ изменения количества СИРК Кребс-2 в нативном асците и асците после обработки цитостатиком циклофосфамом (ЦФ). В нативном асците количество СИРК осциллирует на определенном уровне. После обработки циклофосфамом их количество относительно оставшихся после масштабного апоптоза коммитированных раковых клеток увеличивается по сравнению с исходным, что предполагает пониженную чувствительность СИРК к действию циклофосфана. Тем не менее произошедшая в результате проведенных обработок синхронизация СИРК в чувствительной фазе клеточного цикла делает их доступными для действия терапевтических агентов. Охарактеризован режим синергичного воздействия циклофосфана и препарата ДНК на развивающуюся асцитную опухоль Кребс-2, приводящего к полному вылечиванию 50 % экспериментальных животных. Этот режим включает трехкратные инъекции цитостатика циклофосфана в конечные точки каждого из трех последовательных репаративных циклов, дополненные инъекциями препарата двуцепочечной ДНК через 18 ч после каждой инъекции циклофосфана, и финальную обработку цитостатиком и препаратом ДНК в момент синхронизации клеток асцита в чувствительной фазе клеточного цикла после первичных обработок. Первые три инъекции «ЦФ + ДНК» необходимы для ареста всех асцитных клеток Кребс-2 в поздней S-G2-M-фазе и их синхронного выхода в G1-S-фазе следующего клеточного цикла. Момент такого синхронного выхода определен как принципиальная временная

Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites

E.A. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.S. Proskurina¹, Ya.R. Efremov^{1, 2}, O.S. Taranov³, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1, 2}, T.D. Dubatolova⁴, D.D. Petrova⁵, E.I. Vereschagin⁶, A.M. Minkevich¹, O.M. Andrushkevich^{1, 2}, S.I. Baiborodin^{1, 2}, V.A. Rogachev¹, A.A. Ostanin⁷, E.R. Chernykh⁷, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

⁴ Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Russia

⁵ The Specialized Educational Scientific Center at Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁶ Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

⁷ Institute of Clinical Immunology, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

Cumulative evidence obtained in this series of studies has guided the logic behind the development of a novel composite dsDNA-based preparation whose therapeutic application according to the specific regimen completely cures the mice engrafted with otherwise lethal Krebs-2 ascites. The likely mechanism involves elimination of TAMRA+ tumor-inducing stem cells (TISCs) from Krebs-2 tumors. We performed quantitative analysis of TISC dynamics in Krebs-2

точка финальной обработки препаратами, приводящей к эрадикации опухолевого начала рака Кребс-2. Дополнительно оцениваются некоторые биохимические, клеточные и патоморфологические параметры состояния экспериментальных животных в различных фазах лечения.

Ключевые слова: двуцепочечная ДНК, циклофосфан, асцит Кребс-2, стволовые иницирующие раковые клетки, репарация, ремиссия, NER, гомологичная рекомбинация, системная воспалительная реакция, полиорганная недостаточность.

ascites following treatment with the cytostatic drug cyclophosphamide (CP) and untreated control cells. In intact ascites, TISC percentage oscillates around a certain value. Following CP treatment and massive apoptosis of committed cancer cell subpopulation, we observed relative increase in TISC percentage, which is consistent with reduced susceptibility of TISCs to CP. Nonetheless, this treatment apparently synchronizes TISCs in a cell cycle phase when they become sensitive to further drug treatments. We describe the regimen of synergistic DNA + CP activity against Krebs-2 ascites. This protocol results in a complete cure of 50 % of Krebs-2 engrafted mice and involves three metronomic injections of CP exactly at the timepoints when repair cycles are about to finish combined with dsDNA injections 18 hours following each CP injection. The "final shot" uses CP + DNA treatment, which targets the surviving yet highly synchronized and therefore treatment-sensitive cells. The first three CP/DNA injections appear to arrest Krebs-2 cells in late S-G2-M phase and result in their simultaneous progression into G1-S phase. The timing of the "final shot" is crucial for the successful treatment, which eradicates tumorigenic cell subpopulation from Krebs-2 ascites. Additionally, we quantified the changes in several biochemical, cellular and morphopathological parameters in mice throughout different treatment stages.

Key words: double-stranded DNA; cyclophosphamide; Krebs-2 ascites; tumor-initiating stem cells; repair; remission; NER; homologous recombination; systemic inflammatory reaction; multiple organ failure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Николин В.П., Попова Н.А., Дубатолова Т.Д., Петрова Д.Д., Верещагин Е.И., Минкевич А.М., Андрушкевич О.М., Байбородин С.И., Рогачев В.А., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Разработка регламента терапевтического режима, основанного на синергичном действии циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК, приводящего к полному излечиванию экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мыши Кребс-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):723-735. DOI 10.18699/VJ16.162

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Ya.R., Taranov O.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dubatolova T.D., Petrova D.D., Vereschagin E.I., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Ostaniin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):723-735. DOI 10.18699/VJ16.162

Настоящая работа завершает цикл из четырех статей, посвященных поиску стратегии лечения асцитной формы рака на модели мышинной опухоли Кребс-2. Проблема терапии малигнизированного асцита рассматривалась в первых двух статьях (Поттер и др., 2016а, б).

В предыдущих исследованиях нами установлены следующие важные моменты.

- Действие нативной ДНК человека при ее введении мышам с 7–9-дневным асцитом в отрезок времени 1–12 ч после инъекции ЦФ приводит к разрушению опухолевого потенциала перевиваемых опухолевых клеток (Поттер и др., 2016а).
- Действие нативной ДНК человека при ее введении мышам с 7–9-дневным асцитом в отрезок времени 18–30 ч после инъекции ЦФ защищает опухолевые клетки от действия цитостатика (Поттер и др., 2016а).
- Действие кросс-линкированной ДНК в форме монопрепарата на фоне инъекции ЦФ смертельно токсично для экспериментальных животных (Поттер и др., 2016б).
- Единичная инъекция препарата нативной ДНК человека (0,5 мг) мышам с 7–9-дневным асцитом через 18 ч

после введения ЦФ разрушает опухолевые свойства графта аналогично ежечасным инъекциям препарата ДНК в режиме 1–12 ч после введения ЦФ (Поттер и др., 2016а).

- Известно, что популяция TAMRA+ раковых клеток асцита Кребс-2, обладающих свойствами стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК), на 40 % пересекается с популяцией CD34+ клеток (Dolgova et al., 2014). При этом популяция CD34+ клеток на 90 % состоит из TAMRA+ клеток. Показано, что синергичное действие ЦФ и препарата двуцепочечной ДНК (дцДНК) человека приводит к снижению количества CD34+ клеток в популяции клеток Кребс-2 (Поттер и др., 2016а). Полученный факт мог означать, что предлагаемая обработка воздействует на СИРК Кребс-2, а их элиминация, в свою очередь, приводит к потере опухолевого потенциала раковыми клетками.
- Проведенные исследования режимов воздействия на разлитый 5-суточный асцит *in vivo* продемонстрировали следующий терапевтический эффект. Терапия цитостатиком ЦФ (0, 20, 36 и 56 ч), метрономное введение на-

тивной дцДНК человека (hDNA) в режиме 1–20 ч после инъекции ЦФ и продолжающие их ежедневные инъекции смеси нативной и кросс-линкированной дцДНК спермы лосося (ssDNAmix) в режиме 20–36 ч после инъекции ЦФ приводят к акцидентальной регрессии асцита у всей группы экспериментальных животных с последующей продолжительной (в течение 9 суток у 100 % животных в группе) ремиссией и с обязательным развитием вторичного рака (Поттер и др., 2016б).

- Компиляция полученных фактов позволила сделать предположение, что в проводимом *in vivo* лечении асцита вместо многочасового метрономного введения можно использовать режим одной инъекции нового композиционного препарата DNAmix (hDNA+ssDNAmix) через 18 ч после введения ЦФ (суммарная доза дцДНК 6 мг), который будет сочетать все свойства, необходимые для проявления терапевтического эффекта. Эксперименты показали, что трехкратное повторение такого режима (инъекции ЦФ в 0, 36 и 72 ч и инъекции DNAmix через 18 ч после каждого введения ЦФ) приводит к полной эрадикации первичного асцита у 100 % животных. Фаза ремиссии продолжается 8 суток (Поттер и др., 2016в). Однако впоследствии у всех экспериментальных животных развивается вторичный асцит.

Таким образом, нами была сформулирована концепция использования сложнокомпозиционного препарата на основе нативной дцДНК человека и смеси нативной и кросс-линкированной дцДНК лосося. Если инъекция композиции препаратов дцДНК проводится в точку демаркации NER (nucleotide excision repair) и HR (homologous recombination) (18 ч после введения ЦФ), т. е. составляющие препарата одновременно воздействуют на конечные этапы NER и на начальные этапы HR, то перекрывается любая возможность для СИРК корректно завершить репарацию межцепочечных сшивок (МЦС) (Поттер и др., 2016в). Трехкратное повторение такой процедуры с интервалом между инъекциями ЦФ в 36 ч позволяет полностью элиминировать первичный асцит. СИРК разрушаются или теряется их опухолевый потенциал и тем самым элиминируется опухолевое начало опухоли. Однако впоследствии всегда развивается вторичный рак. Существуют две главные причины рецидива: контаминация СИРК при терапевтических проколах брюшной стенки животных и нечувствительность части СИРК к терапии или их способность переживать терапию.

Первый фактор был преодолен введением в терапевтическую процедуру единственной в рамках одного терапевтического цикла инъекции сложнокомпозиционного препарата на основе дцДНК (Поттер и др., 2016в).

Второй фактор мог быть связан с ускользанием СИРК, находящихся в момент обработки ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла, от терапевтического воздействия экстраклеточных фрагментов дцДНК. Как предполагается в первом варианте объяснения, у СИРК в G2-M-фазе отсутствует свойство интернализации экстраклеточных дцДНК (Dolgova et al., 2016), и они не обладают свойством репарировать МЦС в G2-M. Тогда при их переходе в G1-S МЦС будут обнаружены и репарированы. При этом СИРК сохраняют жизнеспособность, что приведет к рецидиву. Возможно и другое объяснение. СИРК в G2-M захваты-

вают фрагменты дцДНК и одновременно способны обнаруживать и репарировать МЦС без репликации (Долгова и др., 2010). Тогда при переходе в G1-S эти клетки будут также нечувствительны к фрагментам экстраклеточной дцДНК внутриклеточной локализации, что тоже вызовет рецидив. Для того чтобы избежать неконтролируемого ускользания СИРК от проводимой терапии, был введен режим нескольких инъекций ЦФ в точку «0» и далее в фазы окончания каждого репаративного цикла и выхода, по-видимому, нечувствительных к обработке ЦФ и ДНК G2-M СИРК в следующую по очереди G1-S-фазу клеточного цикла – 36 и 72 ч (Поттер и др., 2016в).

Исходя из этих рассуждений, мы предположили, что необходима финальная обработка терапевтическими препаратами, которая приведет к полной элиминации оставшихся СИРК, избежавших предыдущих обработок. В связи с этим было охарактеризовано состояние раковых клеток асцита в момент регрессии опухоли и во время появления вторичного асцита. Проведен цитологический анализ состояния клеток асцита Кребс-2 и их распределение по клеточному циклу на протяжении развития опухоли без и после воздействия ЦФ. Также оценено процентное содержание TAMRA-позитивных клеток в различные дни развития асцита – в норме и после проведенных обработок. И наконец, проанализированы основные показатели состояния клеток крови и костного мозга животных в момент регрессии и ремиссии опухоли и патоморфологические характеристики животных, погибающих после проведенных обработок.

Материалы и методы

Подробная информация о методах исследования, экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося, подготовке кросс-линкированного нитроген-мустардом препарата ДНК приведена в статье (Alyamkina et al., 2015).

Метод статистической обработки данных описан в работе (Поттер и др., 2016б). Методики введения препаратов циклофосфана, экзогенной ДНК и антибиотика гентамицина, активации адаптивного иммунитета, пересадки клеток костного мозга, оценки ремиссии асцитной опухоли Кребс-2 рассмотрены в статье (Поттер и др., 2016б).

Метод анализа захвата клетками TAMRA-меченого ДНК-зонда подробно описан в статье (Dolgova et al., 2014).

Анализ клеточного цикла в клетках асцита Кребс-2 после трех инъекций ЦФ с интервалом в 36 ч

Мышам был привит асцит Кребс-2 в количестве 2 млн/мышь. На 5-е сутки была сделана первая инъекция ЦФ (100 мг/кг), через 36 и 72 ч – две аналогичные инъекции. Одновременно с этим у мышей отбирали асцит для проведения анализа распределения клеток асцита по клеточному циклу (0, 18, 54, 90 ч после первой инъекции ЦФ). Для этого небольшое количество асцита (около 50 мкл) отбирали шприцем, промывали PBS один раз, считали в камере Горяева и фиксировали 600 тыс. клеток в 50 % метаноле (в объеме ~300 мкл, при этом метанол по каплям приливали в суспензию клеток). Когда все образцы были собраны, клетки осаждали, промывали один раз PBS,

ресуспендировали в 200 мкл PBS, обрабатывали РНКазой (200 мкг/мл, 30 мин при 37 °C). Затем еще раз осаждали, ресуспендировали в 400 мкл PBS и добавляли краситель PI до концентрации 10 мкг/мл. Затем делали анализ клеточного цикла на проточном цитофотометре BD FACS Aria. Распределение по клеточному циклу оценивали методом One Way ANOVA.

Анализ фрагментации клеток асцита Кребс-2 после трех инъекций ЦФ

В определенные промежутки времени у мышей с асцитом, обработанных цитостатиком ЦФ по схеме (0, 36, 72 ч), отбирали асцит, считали клетки в камере Горяева. На препарат брали по 150 тыс. клеток в 50 мкл среды RPMI-1640, сажали на стекло цитоспином, покрывали глицерином и покровным стеклом. Фотографировали в проходящем свете с помощью микроскопа AxioScope 2 Plus (Zeiss) и анализировали при помощи программы AxioVision.

Перевивка вторичного асцита

У мышей с развивающимся вторичным асцитом отбирали по 300 мкл асцита, осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин) супернатант отбирали, клетки ресуспендировали в 300 мкл среды RPMI-1640. Полученную суспензию асцитных клеток из каждой индивидуальной мыши прививали трем интактным животным в заднюю правую лапу по 100 мкл.

Выделение клеток асцита Кребс-2 на фиколл-верографиковом градиенте

У мыши после терапевтических процедур отбирали 0,1 мл асцита, ресуспендировали в 3 мл PBS и наносили на 3 мл фиколл-верографина (плотность 1,077 г/см³), ц/ф 30 мин, 1500 об/мин. Верхнее интерфазное кольцо отбирали, промывая пипеткой слой жидкости над ним, промывали один раз PBS.

Анализ площади клеток асцита Кребс-2

Измерение площадей асцитных клеток Кребс-2 выполняли с помощью программы Image J (площадь клетки выражена в пикселях, значения представлены в $\times 10^3$ пиксель).

Анализ уровня ЛДГ в асцитной жидкости экспериментальных мышей

На 8-е сутки после первой инъекции ЦФ во время регрессии асцита и во время появления вторичного асцита (разные дни для всех животных) отбирали по 100 мкл асцита, осаждали клетки, по 50 мкл асцитной жидкости замораживали для анализа уровня ЛДГ, который проводили в лаборатории «Сиблабсервис».

Анализ клеток крови и костного мозга мышей

Из хвостовой вены мышей отбирали каплю крови, делали мазок на предметном стекле. Животных в предсмертном состоянии с характерным симптомокомплексом забивали и делали на стекле отпечатки срезов грудины. Мазки и отпечатки на стеклах фиксировали в метаноле 7–10 мин, окрашивали красителем Гимза (Merck) в течение 30 мин. Препараты смотрели под иммерсионным объективом $\times 100$, микроскоп Leica DM4000 B.

Результаты и обсуждение

Характеристика некоторых свойств раковых клеток асцита Кребс-2 интактных и после инъекций ЦФ

Как показано ранее, TAMRA+ клетки – это опухолевые раковые клетки асцита Кребс-2 (стволовые иницирующие раковые клетки) (Dolgova et al., 2014). При анализе состояния клеток по ходу развития интактного асцита были обнаружены следующие явления.

На протяжении всего времени развития асцита содержание TAMRA+ клеток колеблется от 0,5 до 3 %. Для одной группы животных этот показатель достоверно осциллировал (рис. 1, а). Период осцилляции составлял примерно 4 суток. Для второй группы мышей четкой осцилляции не обнаруживалось, а количество TAMRA+ клеток достигало пиковых значений на 12-е сутки (см. рис. 1, б). Для третьей группы мышей наблюдался провал в количестве и процентном отношении TAMRA+ клеток на 10-е сутки развития асцита (см. рис. 1, в). Абсолютное количество TAMRA+ клеток в группе с максимальным падением на 10-е сутки менялось от ~6 млн на 6-е сутки до ~1 млн на 10-е сутки и до ~11 млн на 14-е сутки.

Сохранение на определенном уровне доли TAMRA+ клеток может означать, что после некоторого числа делений эти клетки теряют свою способность интернализировать TAMRA-меченый ДНК-зонд. При этом для поддержания статус-кво сообщества раковых клеток Кребс-2 требуется около 0,5–3 % TAMRA+ СИРК, и на определенную массу раковых клеток должно присутствовать определенное количество «клеток-операторов». Возможно, TAMRA+ клетки и являются такими операторами, поддерживающими гомеостаз асцитного сообщества клеток.

Известно, что СИРК может делиться как симметрично, давая такую же плюрипотентную клетку, так и несимметрично, давая коммитированного потомка. Последний, обладая конечным, но значительным пролиферативным потенциалом, продуцирует множество дифференцированных раковых клеток (Deleyrolle et al., 2011; Lathia et al., 2011; Gómez-López et al., 2014; Pine, Liu, 2014).

Как следует из оценки динамики процентного соотношения TAMRA+ клеток, не все TAMRA-позитивные клетки являются предшественниками, стоящими на вершине иерархической лестницы раковых клеток Кребс-2. По-видимому, к СИРК относятся те TAMRA+ клетки и то их минимальное количество (составляющее менее 1 % и 1 млн в численном выражении для различных животных), до которого падает их число в определенных точках наблюдения. Оставшиеся TAMRA+ клетки представляют собой коммитированных потомков первого эшелона с высокой пролиферативной активностью. После определенного числа делений они в очередной раз делятся, теряя свойство захватывать ДНК-зонд, и переходят в статус дифференцированных клеток. Именно этот переход детектируется как резкое падение процентного содержания и абсолютного числа TAMRA+ клеток до минимального, а также как наблюдаемые падения при осцилляции. Далее идет фаза несимметричного деления СИРК (менее 1 %), дающих прослойку TAMRA+ потомков первого эшелона коммитирования, которая увеличивает долю TAMRA-позитивных клеток в асците до характерных 0,5–3 %.

Такое соотношение поддерживается на протяжении всего периода развития асцита. Можно полагать, что TAMRA+ СИРК в процессе становления и первых дней развития асцита претерпевают серию симметричных делений, образуя необходимое базовое количество «клеток-операторов». Мы не исключаем варианта существования еще более низкодифференцированных плюрипотентных клеток, не обладающих свойством интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК. Тем не менее TAMRA+ клетки обладают основными свойствами СИРК и относятся именно к этой популяции раковых клеток асцита Кребс-2 (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016а–в).

Поскольку установлено, что проведенная терапия приводит у всей группы животных к полной регрессии асцита, восьмисуточной ремиссии и последующему развитию вторичного рака (Поттер и др., 2016а), мы предположили, что при всех процедурах всегда остается опухолевое начало опухоли, представляющее собой, по-видимому, для асцита Кребс-2 TAMRA+ СИРК (Dolgova et al., 2014). В этой связи была проведена серия экспериментов, анализирующих состояние TAMRA+ СИРК асцита Кребс-2 после обработок.

При анализе состояния клеток после обработки ЦФ установлено, что последовательные инъекции ЦФ в четко определенные временные точки приводят к аресту раковых клеток в S-фазе на 18 ч и сдвигу ареста в позднюю S-G2-M-фазу на 54 ч эксперимента (рис. 2). На 90 ч эксперимента четкое деление клеток по количеству хроматина исчезает, а клеточный материал уходит в зону апоптотического «мусора» (см. рис. 2).

К 7-м суткам от первой инъекции ЦФ происходит полное апоптотическое разрушение всей массы асцитных раковых клеток, что подтверждается микроскопическим и электрофоретическим анализом (рис. 3, а, в). На электрофореграмме видна характерная апоптотическая лестница, свидетельствующая о том, что часть ДНК клеток асцита подверглась нуклеосомной фрагментации (см. рис. 3, в, средний блок). К 8–12-м суткам апоптотический дебрис переходит в состояние вторичного некроза (в, правый блок). Цитофлуоресцентный анализ оставшихся неразрушенными в момент апоптотической фрагментации основной массы раковых клеток (9-е сутки от введения цитостатика), выделенных на фиколл-вероградиновом градиенте, свидетельствовал о присутствии в образце 12,9 % TAMRA-позитивных клеток, что в 4–25 раз превышает их количество в исходном асците (см. рис. 3, б). Оценка фазы клеточного цикла этих клеток показала, что все они находятся в G1-фазе (см. рис. 3, б3).

Состояние полного разрушения асцита как патоморфологического образования продолжается примерно 5–7 суток и сопровождается визуально детектируемым и экспериментально подтвержденным уходом асцитной жидкости (фаза ремиссии) (Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016в; настоящее исследование). К 15–19-м суткам асцит появляется снова, и доля TAMRA+ клеток возвращается к норме, составляющей ~0,5–3 % (данные не приводятся).

Важнейшим в логике разрабатываемой стратегии эрадикации асцита Кребс-2 является соединение результатов, полученных в первой статье цикла (Поттер и др., 2016а), где анализировалось состояние TAMRA+/CD34+ клеток,

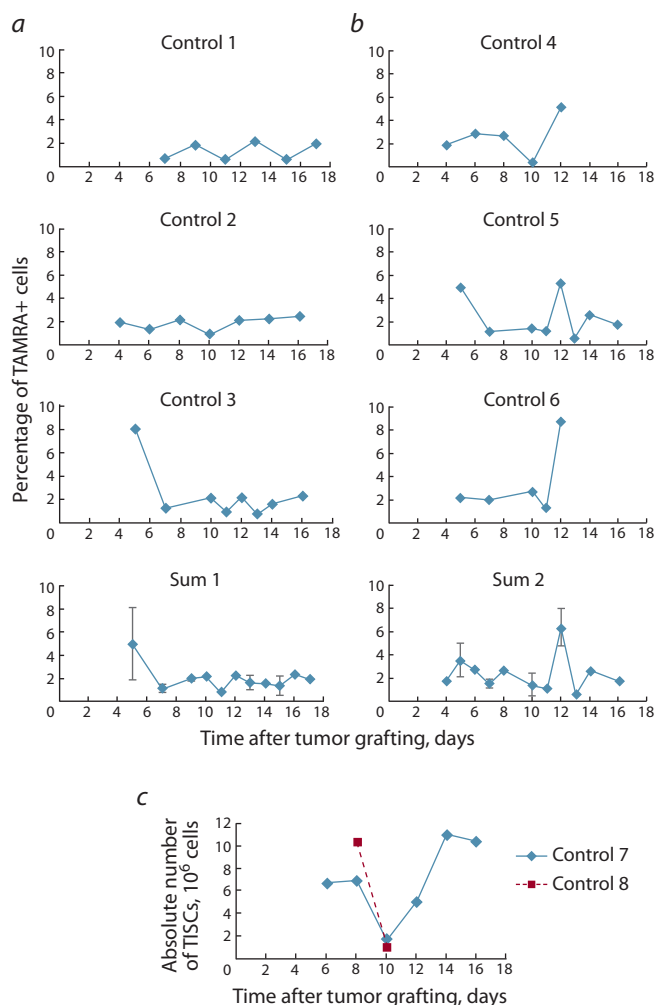


Fig. 1. Changes in the percentage and absolute numbers of TAMRA+ TISCs in intact Krebs-2 ascites.

(a) group 1, showing oscillation in TAMRA+ cell counts with a period of ~4 days; (b) group 2, showing a pronounced peak in TAMRA+ cells on day 12 following ascites engraftment; (c) abortive ascites remission followed by relapse to the initial levels of TAMRA+ cells in two animals; control 1-8, values measured for six individual animals; sum 1 and sum 2 are average values for groups; standard deviation ($n = 3$) is shown on the summarizing plots.

обработанных ЦФ в синергизме с препаратом дцДНК, и результатов настоящего исследования. В ранних экспериментах установлено, что добавление в терапию ЦФ метромомного введения препарата дцДНК приводит к элиминации TAMRA+/CD34+ клеток, что коррелирует с разрушением опухоленности перевиваемого, обработанного таким образом Кребс-2 трансплантата. Эти эксперименты означали, что экстраклеточная дцДНК воздействует на TAMRA+ клетки, лишая их опухолевого потенциала.

Режим полного вылечивания

50 % экспериментальных мышей от асцита Кребс-2

Таким образом, обнаружено, что после ориентированного на фазы репаративного цикла трехкратного введения ЦФ происходит масштабное одновременное апоптотическое

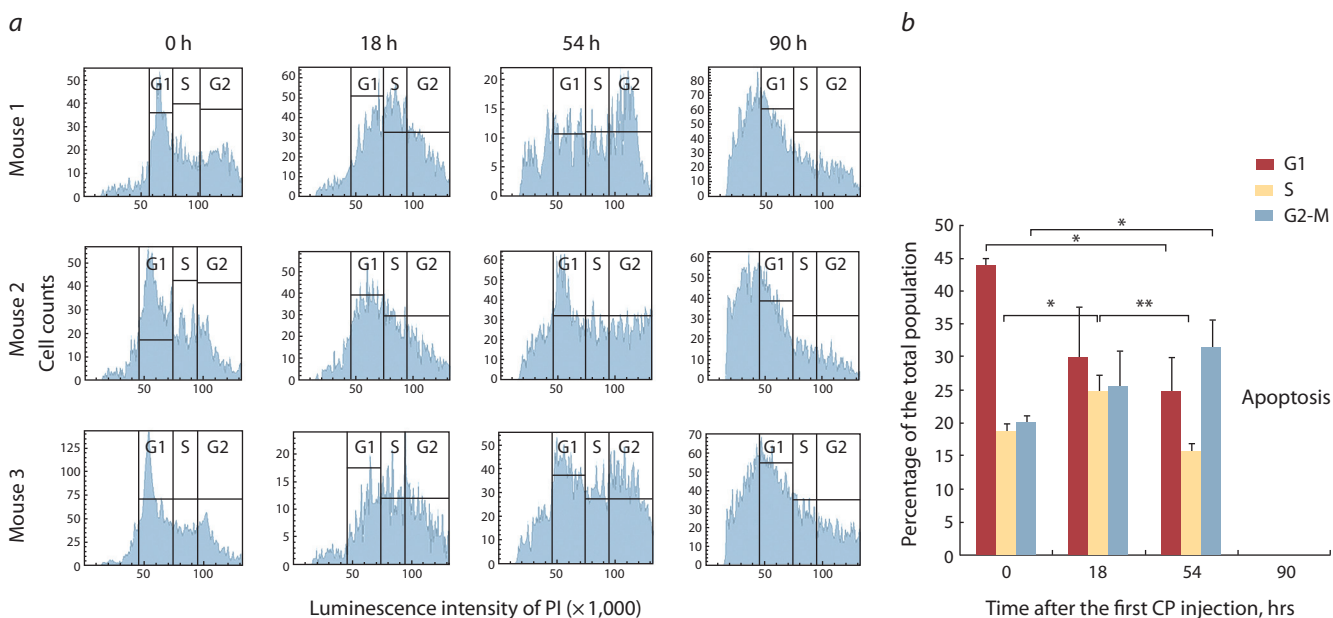


Fig. 2. Cell cycle profiling of Krebs-2 ascites cells with three CP treatments.

(a) cell cycle analysis of Krebs-2 ascites from mice that received three injections of CP (100 mg/kg body weight at 0, 36, 72 hrs). Measurements were taken at the initial (pre-treatment) point and 18, 54, and 90 hrs after the first CP injection ($n = 3$); (b) cell cycle distribution of Krebs-2 cells after CP treatment. Standard deviation ($n = 3$) is shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n = 3$).

разрушение раковых клеток. При этом все сохранившие морфологическую целостность асцитные раковые клетки (выделенные на фиколл-верографиковом градиенте) находятся в G1-S-фазе клеточного цикла, а количество TAMRA+ клеток в этой фракции достигает ~13 %, что подразумевает концентрацию выживших после терапии СИРК. Компиляция этих фактов позволила сформулировать следующую гипотезу.

В клеточном сообществе асцитных раковых клеток существуют две дискриминируемые по признаку интернализации TAMRA-меченой ДНК популяции клеток: захватывающие ДНК-зонд (TAMRA+ клетки) и не захватывающие его (TAMRA- клетки). Известно, что TAMRA+ клетки обладают свойствами СИРК (Dolgova et al., 2014). Сделано предположение, что эти две популяции клеток по-разному завершают арест в поздней S-G2-M-фазе клеточного цикла. Коммитированные раковые клетки разрушаются апоптозом с последующим вторичным некрозом (Alyamkina et al., 2015; настоящее исследование, рис. 3). Часть генетически экстремально пластичных TAMRA+ СИРК выдерживают терапию и после завершения ареста в поздней S-G2-M-фазе выходят из репаративного процесса и стремятся завершить деление. Происходит полная синхронизация всех выживших после проведенной терапии СИРК, и они одновременно входят в первую после ареста G1-S-фазу (как это следует из анализа состояния клеточного цикла и процента TAMRA+ клеток на 9-й день обработок).

Было сделано важнейшее заключение, что именно эта точка может позволить нанести завершающий удар по всем оставшимся причинным СИРК Кребс-2. Без финального удара через несколько суток произойдет естественное расхождение раковых клеток, в том числе СИРК, по

фазам клеточного цикла, и СИРК станут недостижимыми для дополнительной однократной обработки по схеме разрабатываемого терапевтического режима.

Нами проведено два полномасштабных эксперимента для проверки предложенной гипотезы терминальной обработки сохранившихся асцитных клеток Кребс-2 в фазу синхронного выхода в G1-S (частично результаты экспериментов представлены в работе (Potter et al., 2016)). Последняя обработка для первого эксперимента была осуществлена на 8-е, для второго – на 12-е сутки от введения ЦФ. Результаты экспериментов представлены на рис. 4.

Особое внимание в экспериментах было сконцентрировано на двух группах. Группа, где проводилась обработка композиционным препаратом дцДНК (ЦФ + ДНК), и группа, где проводилась обработка тем же препаратом, но в ассоциации с белком протамином (ЦФ + ДНК + протамин). Введение этого дополнительного компонента позволяет в 10 раз снизить терапевтическую дозу препарата ДНК, сохраняя высокий терапевтический эффект (Поттер и др., 2016а).

Оказалось, что предложенное решение приводит к полному выживанию 50 % мышей от асцитной формы рака Кребс-2. И ЦФ, и комбинированное действие ЦФ и препарата дцДНК/дцДНК + протамин демонстрировали ярко выраженный терапевтический эффект на развитие асцита.

В первом эксперименте в группе «ЦФ» к 80 дню эксперимента последнее животное было с раковым асцитом и погибло в течение недели (см. рис. 4, а). В экспериментальных группах «ЦФ + ДНК» и «ЦФ + ДНК + протамин» к 80-м суткам эксперимента у 50 % животных обеих групп вторичный асцит не проявился. К 100-му дню эксперимента у одной мыши в группе «ЦФ + ДНК + протамин» по-

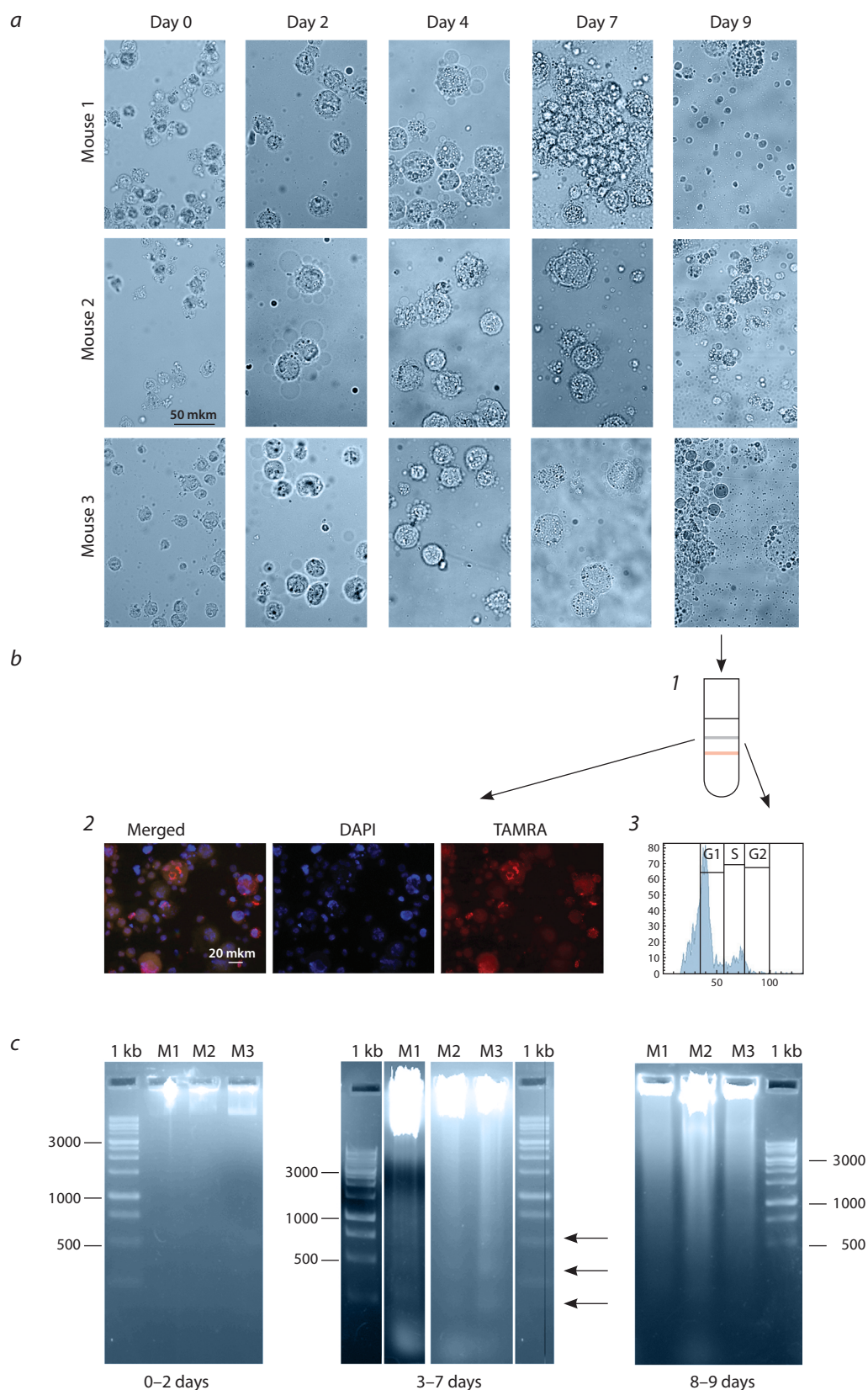


Fig. 3. Analysis of Krebs-2 cell status following CP treatment *in vivo*.

(a) Morphology of Krebs-2 ascites cells on day 9 after CP treatment ($n = 3$). (b) Krebs-2 fractionation in a ficoll-verografin density gradient: 1. On day 9 after the CP treatment: Krebs-2 cells in the top fraction, and apoptotic cell debris is present in the bottom fraction. 2. Cytofluorescence analysis of the top fraction showing the percentage of TAMRA+ Krebs-2 cells. 3. Cell cycle profiling of Krebs-2 cells present in the top fraction. (c) Electrophoresis of DNA isolated from Krebs-2 ascites cells in 1% agarose (shown in Fig. 3a).

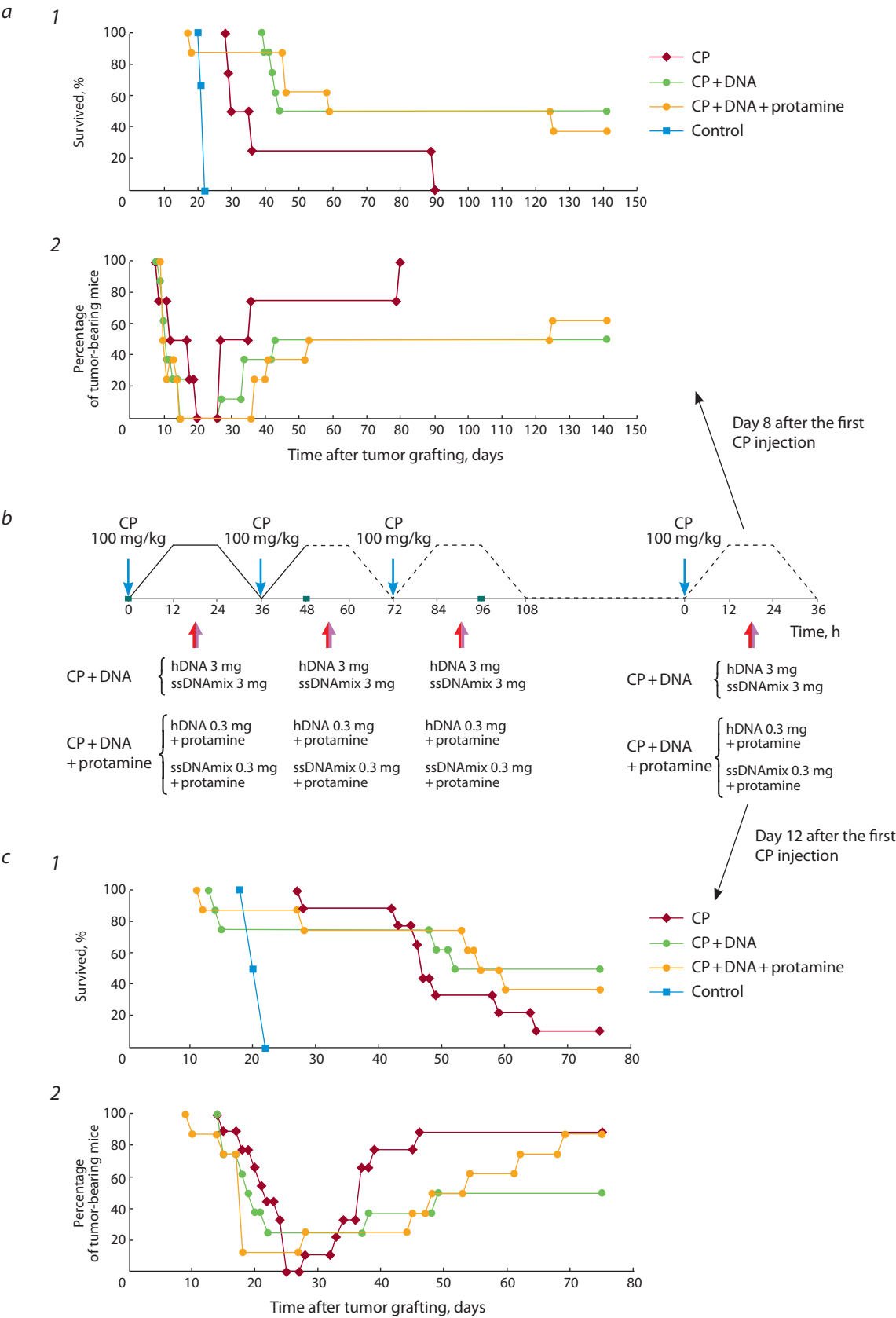


Fig. 4. Analysis of the synergic anti-ascites activity of CP plus human and salmon sperm DNA in the presence or absence of protamine. (a) Synergic activity of CP and dsDNA preparation administered following the “3 + 1 CP + dsDNA” schedule, with the last injection cycle given on day 8 after the first CP injection ($n = 8$); (b) scheme of the treatment in experiments *a* and *c*; (c) synergic activity of CP and dsDNA preparation administered following the “3 + 1 CP + dsDNA” schedule, with the last injection cycle given on day 12 after the first CP injection ($n = 8$). 1, Survival plot; 2, ascites remission in the experimental groups.

явилась солидная опухоль в районе шеи, и к 130-му дню животное погибло. Оставшиеся 7 животных этого эксперимента прожили 8–12 месяцев без признаков опухоли.

Во втором эксперименте дополнительная терапия была проведена на 12-е сутки после первой инъекции ЦФ, т. е. на четверо суток позже, чем в первом (см. рис. 4, б, в). Такой подход позволил частично оценить продолжительность терминального терапевтического отрезка времени. Так же как и в предыдущем эксперименте, обе группы животных демонстрировали высокую эффективность предлагаемой терапии.

В обоих экспериментах была достигнута 50 % выживаемость мышей для группы «ЦФ+ДНК». Причинами гибели животных в экспериментальных группах были развитие вторичной опухоли и развитие неуправляемой полиорганной недостаточности (ПОН) (Поттер и др., 2016б). В первом эксперименте из 50 % погибших животных (см. рис. 4, а) в каждой группе по одной мыши погибло от ПОН без признаков асцита, по три мыши – от развившегося вторичного асцита. Во втором эксперименте в группе «ЦФ+ДНК» одна мышь погибла от ПОН без признаков асцита, три животных – с асцитом. В группе «ЦФ+ДНК+протамин» две мыши погибли без асцита, пять – с асцитом.

Что же произошло при использовании режима «3+1 ЦФ+ДНК»? Первые три инъекции ЦФ одна за другой уменьшают количество клеток, остающихся не подверженными воздействию ЦФ. Каждый раз при введении ЦФ через 36 ч после предыдущей инъекции новая обработка приходится на время, когда часть популяции TAMRA-ДНК интернализирующих клеток, находившаяся в G2-M-фазе клеточного цикла и не чувствительная к ЦФ, переходит в G1-S-фазу и становится чувствительной к обработке цитостатиком. Одновременно каждая следующая инъекция ЦФ повторно запирает в G2-фазе готовые выйти из нее клетки первой очереди воздействия, т. е. очередная обработка ЦФ индуцирует новые кросс-линки в клетках, уже залечивших сшивки от предыдущей обработки, и не дает им перейти в митоз. Происходит полномасштабная синхронизация раковых клеток, включая СИРК Кребс-2, в поздней S-G2-M-фазе. При добавлении препарата ДНК в точку разделения двух репаративных фаз идет интерференция репаративного процесса по двум векторам – NER и HR. На 8-е сутки после обработки детектируется тотальное масштабное разрушение асцитных раковых клеток. Коммитированные клетки уходят в апоптоз. Часть генетически пластичных СИРК, выживших при проведенной терапии, синхронно завершают деление и входят в первую после ареста G1-S-фазу клеточного цикла. Экспериментально было подтверждено предположение, что если в это время еще раз провести обработку ЦФ и ДНК в указанном режиме, то наблюдается полная эрадикация СИРК и разрушение опухоленоса начала опухоли. Без дополнительного вмешательства (иммунокоррекция, антисепсическая терапия) выживает 50 % животных. При этом патоморфологический анализ свидетельствует об отсутствии у обработанных в указанном режиме мышей значимых патологий тканей и органов, что подразумевает возможность переноса данной терапии на человека (Potter et al., 2016).

Тот факт, что полностью вылечивается и выживает только половина экспериментальных животных, объясняется следующими причинами. У каждого индивидуального животного фаза тотальной апоптотической фрагментации раковых клеток сдвинута на 1–5 суток в зависимости от индивидуальных особенностей животного и прививаемого асцита (см. рис. 3, а). Это означает, что при программной терминальной обработке, проведенной в усредненный день тотального разрушения раковых клеток (например, 8-й или 12-й в наших экспериментах), у части животных чувствительная фаза к терминальной обработке или еще не наступила, или уже прошла. Именно у этих животных и развивается вторичный рак. ПОН, которая также вносит свой вклад в выживаемость, наблюдается практически во всех экспериментах и требует дополнительной антисепсической терапии.

Все выжившие мыши-самки были ссажены с самцами. Через два месяца у двух самок из созданных семей появились здоровые мышата – семь и пять соответственно. Одна мышь съела потомство на 3-и сутки, по всей вероятности, из-за отсутствия молока. У второй мыши потомство погибло на 2-е сутки, по всей видимости, также от голода вследствие отсутствия молока у матери. Вторая мышь принесла помет повторно, мышата выжили и развиваются нормально. Таким образом, проверка репродуктивной функции самок после проведенного лечения свидетельствует об отсутствии прямого действия терапии на герминативные пути. Тем не менее гибель потомства у экспериментальных мышей в течение трех дней после рождения от (как предполагается) отсутствия молока указывает на наличие физиологических нарушений, причины которых требуют дополнительных исследований.

В рассматриваемых экспериментах у мышей были оценены некоторые биохимические, клеточные, физиологические и патоморфологические параметры во время регрессии асцита и на отрезке времени развития вторичного асцита или возникновения и развития симптомокомплекса ПОН. Также был проведен патоморфологический анализ органов и тканей мышей в агонистической фазе развития вторичного асцита или ПОН (патоморфологический атлас представлен в работе (Potter et al., 2016)).

Оценка некоторых показателей, характеризующих события, происходящие в организме экспериментальных мышей после проведенных обработок в фазе резорбции первичного асцита и в фазе развития вторичного асцита

В настоящем разделе приводятся некоторые характеристики состояния асцитной жидкости и клеток асцита Кребс-2 после проведенных обработок (рис. 5, а, в–д), а также представлены фотографии, демонстрирующие мышей с развившимся асцитом на 8–10-е сутки и после полной регрессии асцита через 130 суток после прививки опухоли (см. рис. 5, б).

Во время резорбции асцита у экспериментальных животных были проанализированы следующие параметры: процентное содержание TAMRA+ клеток, уровень лактадегидрогеназы (ЛДГ) (см. рис. 5, а1), клеточность и состояние клеток. В фазе рецидива развития асцита анализировали процентное содержание TAMRA+ клеток,

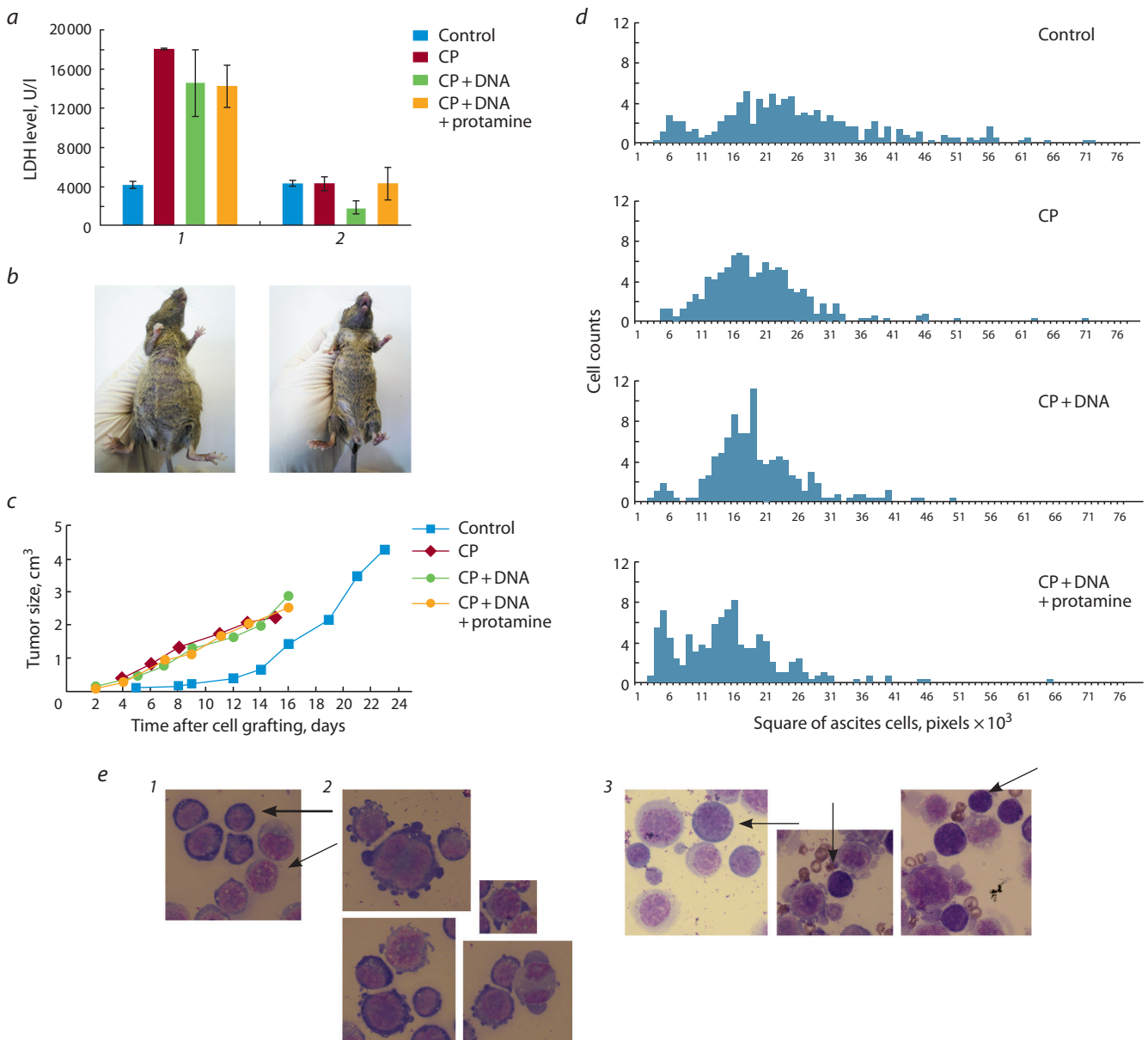


Fig. 5. Summary of several parameters measured in the course of the therapy of ascites-engrafted mice under the "3 + 1 CP + DNA" schedule.

(a) LDH levels in the ascitic fluid of mice: (1) during the ascites remission period and (2) upon ascites re-growth ($n = 3-5$). (b) View of ascites in arbitrarily chosen experimental animals. Left: mouse with an established ascites; right: the same mouse in the remission period (day 130). (c) Growth of solid Krebs-2 transplants taken from experimental animals with secondary ascites ($n = 3$). (d) Ascites cell size distribution in animals from different groups; (e) Examples of morphologically distinct types of ascites cells: 1, cells having basophilic granules (thick arrow) and cells with nongranular cytoplasm (thin arrow), 2, cytoplasm budding, 3, strongly basophilic cells (arrows).

ЛДГ (см. рис. 5, a2), клеточность и состояние клеток, состояние форменных элементов крови и костного мозга у погибающих животных (рис. 6). Для анализа туморогенности вторичного асцита проводилась его перевивка в форме солидного графта (см. рис. 5, в). Дополнительно был проведен частичный патоморфологический анализ погибших животных (Potter et al., 2016). Полученные данные свидетельствовали о следующем.

Процентное содержание TAMRA+ клеток при перевивке находилось в пределах нормы и составляло ~1–3%.

При регрессии асцита подсчет TAMRA-позитивных клеток оказался невозможным, поскольку клеточный дебрис создавал множественные артефакты. В фазе рецидива количество TAMRA+ клеток восстанавливалось до исходного уровня (~1–3%) (данные не приводятся). В исходной точке и в фазе роста вторичного асцита общая клеточность асцитного бульона была на обычном уровне (~200 млн кл./мл). В фазе резорбции асцит плохо отбирался, клеточность была почти в 10 раз ниже исходной, сохранившийся материал имел выраженную апоптотиче-

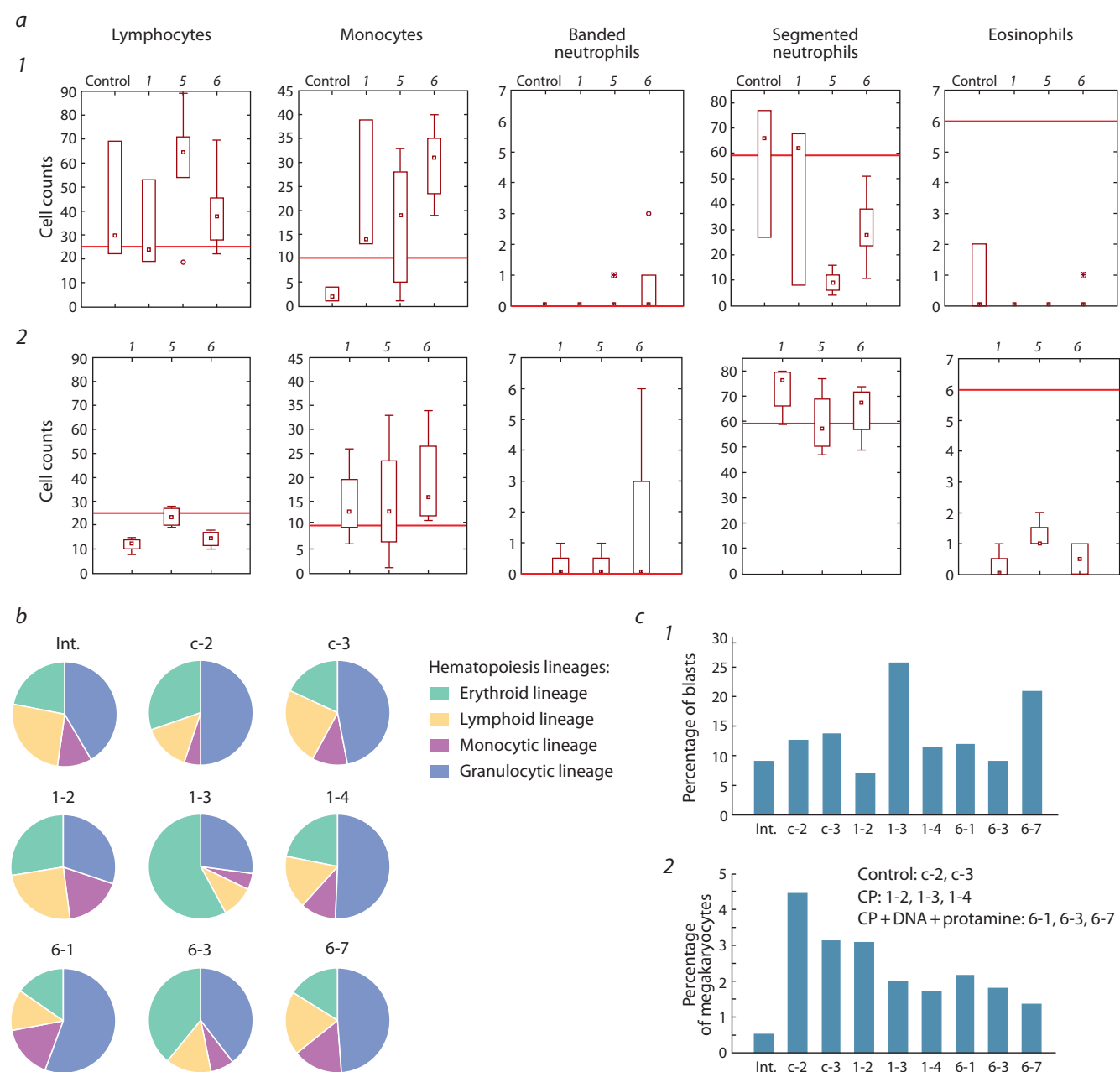


Fig. 6. Blood and bone marrow cell counts in control and treated mice.

(a) Blood cell composition in experimental animals (1) during ascites regression ($n = 4-8$) and (2) when the secondary ascites starts to grow ($n = 4$); red line denotes the value observed in intact animals. (b) Cell composition in the bone marrow from experimental animals, blood cell lineage ratio. (c) Fractions of (1) blast forms and (2) megakaryocytes in the bone marrow of individual mice from the experimental groups. Int, intact animal; c, control animal with a growing ascites ($n = 3$). Treatment: 1, "CP"; 5, "CP + DNA"; 6, "CP + DNA + protamine".

скую деградацию (Alyamkina et al., 2015; настоящее исследование, рис. 3, а, в). Раковые клетки вторичного асцита по размеру отличались от исходных в меньшую сторону (см. рис. 5, з) и обладали рядом морфологических особенностей. В группах «ЦФ», «ЦФ + ДНК», «ЦФ + ДНК + протамин» обнаруживались клетки с резко базофильной цитоплазмой (см. рис. 5, $\partial 1$, жирная стрелка, $\partial 3$), количество которых особенно велико в группах «ЦФ + ДНК» и «ЦФ + ДНК + протамин», и клетки с негранулированной цитоплазмой (см. рис. 5, $\partial 1$, тонкая стрелка). Происхож-

дение этих клеток, вероятно, связано с отпочковыванием клеточного материала, содержащего цитоплазматические гранулы (см. рис. 5, $\partial 2$).

Измерение площадей асцитных клеток приведено на рис. 5, з. В группе мышей, которым препараты не вводились, гистограмма, отображающая изменение площади клеток асцита, представляет собой равномерное распределение от величин $7 \cdot 10^3$ до $70 \cdot 10^3$ пикселей с небольшим подъемом в области значений от $15 \cdot 10^3$ до $33 \cdot 10^3$, пик приходится на размер площади $21 \cdot 10^3$ пикселей. Кривые

распределения площадей в группах «ЦФ», и особенно «ЦФ+ДНК» и «ЦФ+ДНК+протамин», имеют тенденцию к уменьшению ширины гистограммы и концентрированию значений в области $(15-19) \cdot 10^3$. При этом почти исчезают клетки большой площади (со значениями свыше $40 \cdot 10^3$ пикселей), а малые образуют дополнительный пик. Малые значения – это размеры, сравнимые с размерами форменных элементов крови – $(4-9) \cdot 10^3$ пикселей. Также у животных групп «ЦФ+ДНК» и «ЦФ+ДНК+протамин», а также группы «ЦФ» появляются в асцитной жидкости некоторые клеточные элементы, которых нет в контрольных группах, а именно – макрофаги и клетки с базофильной зернистостью, напоминающие тучные клетки (см. рис. 5, д).

При резорбции асцита уровень ЛДГ в асцитной жидкости был повышен в несколько раз по сравнению с контролем (см. рис. 5, а1). Анализ выполняли на 8-й день после первой инъекции ЦФ. При развитии вторичного асцита уровень ЛДГ не отличался от контрольного (см. рис. 5, а2).

Проведенная перевивка вторичного асцита в солидной форме свидетельствовала, что это полноценный опухолевый раковый трансплантат (см. рис. 5, в).

Анализ крови и анализ состояния клеток костного мозга был проведен у мышей с развитым вторичным асцитом или с развившимся патологическим симптомокомплексом ПОН (рис. 6). Показано, что в фазе регрессии асцита наблюдается ярко выраженная нейтропения в группе «ЦФ+ДНК» и нейтропения в группе «ЦФ+ДНК+протамин» (см. рис. 6, а1). Также для группы «ЦФ+ДНК» на стадии развития вторичного асцита характерен лимфоцитоз, что свидетельствует об идущем остром воспалительном процессе. Вторичный асцит у многих животных группы «ЦФ+ДНК» носил характер геморрагического экссудата, свойственного геморрагическому воспалению, когда вследствие генерализованного воспалительного процесса полностью нарушается механизм сосудистой проницаемости и эритроциты в массе выходят в интерстициальное пространство.

Характеристика клеточного состава костного мозга мышей в предсмертной фазе развития вторичной патологии приведена на рис. 6, б, в. Во всех экспериментальных группах (ЦФ, ЦФ+ДНК, ЦФ+ДНК+протамин) увеличено количество мегакариоцитов по сравнению с интактным контролем (см. рис. 6, в2). Для индивидуальных животных всех обследованных групп отмечается незначительное повышение бластных форм (см. рис. 6, в1).

В предыдущих статьях (Поттер и др., 2016а–в) и в работе (Potter et al., 2016) нами был проведен масштабный патоморфологический анализ, позволивший выдвинуть предположение, что гибель мышей с вторичным раком или без него обусловлена развитием системной воспалительной реакции (СВР) и ПОН вследствие проведенных обработок, что связано с масштабной деструкцией асцитных клеток и индукцией вторичного некроза. Некротическое разрушение сопровождается повышением уровня ЛДГ и появлением патоморфологических структур, характерных для воспалительного процесса. Формула крови и данные по клеточному составу костного мозга мышей также предполагают наличие у экспериментальных животных

воспалительного процесса, характерного для злокачественных новообразований или вирусных инфекций, когда часто наблюдаются и нейтропения, и лимфоцитоз. Развивающийся геморрагический вторичный асцит нередко свидетельствует о присутствии в асцитной жидкости большого числа эритроцитов. Эритроциты попадают в асцит пассивно, выталкиваясь из сосудов гидростатическим давлением через расширенные межклеточные щели. Подобная картина характерна для СВР при тяжелейших нарушениях микроциркуляции при таких инфекциях, как чума и сибирская язва. Совокупность результатов проведенных анализов находится в соответствии с патоморфологическими данными и предполагает присутствие у мышей генерализованного воспаления.

Заключение:

Концепция терапевтического регламента

Охарактеризован режим полного вылечивания 50 % экспериментальных животных от асцитной формы рака Кребс-2. Описаны контрольные точки приложения терапевтических обработок, базирующиеся на общебиологических свойствах СИРК Кребс-2, рассмотренных в настоящем цикле статей и в работах (Dolgova et al., 2014; Alyamkina et al., 2015). К таким свойствам относятся способность СИРК Кребс-2 интернализировать фрагменты дцДНК естественным механизмом интернализации (Dolgova et al., 2014) и способность фрагментов дцДНК, доставленных во внутриклеточное пространство СИРК при репарации МЦС, интерферировать процесс репарации таким образом, что СИРК или погибает, или лишается своего опухолевого статуса (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016а).

Базовые факторы терапии, необходимые для полного вылечивания мышей от асцитной формы рака Кребс-2

1. Повторяемость инъекций ЦФ. Первые три инъекции ЦФ, одна за другой, уменьшают количество TAMRA+СИРК, остающихся не подверженными воздействию ЦФ. Каждый раз при введении ЦФ через 36 ч после предыдущей инъекции новая обработка попадает на время, когда часть популяции интернализирующих TAMRA-меченую ДНК клеток, находившихся в G2-M-фазе клеточного цикла и нечувствительных к ЦФ, переходит в G1-S-фазу и становится чувствительной к обработке цитостатиком. Одновременно повторная обработка запирает уже обработанные асцитные клетки в той же поздней S-G2-M-фазе (настоящее исследование).
2. Для полной эрадикации асцита необходимо проводить дополнительную обработку цитостатиком ЦФ и препаратом дцДНК через 18 ч, в момент апоптотического разрушения коммитированных потомков раковых клеток Кребс-2 и синхронного входа СИРК Кребс-2 в G1-S после ареста в поздней S-G2-M-фазе клеточного цикла (8–12-е сутки после первой инъекции ЦФ) (настоящее исследование).
3. При добавлении в терапевтическую процедуру сложнокомпозиционного препарата дцДНК в точку демаркации NER и HR (18 ч после любой инъекции ЦФ) происходит интерференция процесса репарации МЦС. Композиция препарата дцДНК составлена таким образом, что одна

составляющая препарата интерферирует NER, а вторая – HR. Оба эффекта приводят к разрушению СИРК. В ходе трех обработок подавляющая часть популяции СИРК погибает, опухоль в значительной степени теряет туморогенное начало (Поттер и др., 2016в).

Дополнительные факторы

1. В схемах применения эффективного режима в обязательном порядке должна присутствовать антибиотиковая терапия на протяжении всего времени лечения, а также особая диета, используемая при лечении сепсиса (Peshkova et al., 2015).
2. Для купирования последствий масштабного одновременного разрушения асцитных раковых клеток необходимо проводить терапевтические процедуры при развитии асците, характеризующемся объемом 1/10 от веса тела мыши (1–2 мл), в котором содержится 200–300 млн асцитных раковых клеток (Поттер и др., 2016а).
3. Одноразовая доза вводимого препарата ДНК должна составлять 6 мг/мышь (Поттер и др., 2016в).

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-00191.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015;15(32). DOI 10.1186/s12935-015-0180-6.
- Deleyrolle L.P., Ericksson G., Morrison B.J., Lopez J.A., Burrage K., Burrage P., Vescovi A., Rietze R.L., Reynolds B.A. Determination of somatic and cancer stem cell self-renewing symmetric division rate using sphere assays. *PLoS One.* 2011;6(1):e15844. DOI 10.1371/journal.pone.0015844.
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.
- Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Orischenko K.E., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Repair of interstrand crosslinks in a DNA molecule. *Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2010;14(2):332-356. (in Russian)
- Dolgova E.V., Potter E.A., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line. *Stem Cell Res. Ther.* 2016;7(1):76. DOI 10.1186/s13287-016-0338-8.
- Gómez-López S., Lerner R.G., Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71:575-597. DOI 10.1007/s00018-013-1386-1.
- Lathia J.D., Hitomi M., Gallagher J., Gadani S.P., Adkins J., Vasanji A., Liu L., Eyler C.E., Heddleston J.M., Wu Q., Minhas S., Soeda A., Hoepfner D.J., Ravin R., McKay R.D., McLendon R.E., Corbett D., Chenn A., Hjelmeland A.B., Park D.M., Rich J.N. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Disease.* 2011;2(9). DOI 10.1038/cddis.2011.80.
- Peshkova I.V., Bogachev S.S., Drobyazgin E.A., Chikinev Y.V., Mitrofanov I.M., Piontkovskaya K.A., Vereschagin E.I. Effect of glutamine on the nucleic acids exchange during the perioperative period in reconstructive esophagus surgery. *J. Nutr. Health Food.* 2015;2(4). DOI 10.15406/jnhfe.2015.02.00058.
- Pine S.R., Liu W. Asymmetric cell division and template DNA cosegregation in cancer stem cells. *Front Oncol.* 2014;4(226). DOI 10.3389/fonc.2014.00226.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kozel A.V., Rogachev V.A., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016a;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116. (in Russian)
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016b;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117. (in Russian)
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Eradication of Krebs-2 primary ascites via a single-injection regimen of double-stranded DNA after each cyclophosphamide injection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016c;20(5):716-722. DOI 10.18699/VJ16.161. (in Russian)
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice. *Oncotarget.* 2016;7(10):11580-11594. DOI 10.18632/oncotarget.7311.

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 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/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

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

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

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 25.10.2016 г. Формат 60 × 84 ¹/₈. Усл. печ. л. 20,23. Уч.-изд. л. 21,7

Тираж 200 экз. Заказ № 289

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